

未利用天然資源・細胞性粘菌の二次代謝産物に関する研究

著者	石河 真弥
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/40166

平成 20 年度修士論文

未利用天然資源・細胞性粘菌の二次代謝産物に関する研究

東北大学大学院薬学研究科

創薬化学専攻 分子解析化学講座

医薬資源化学分野

学籍番号 A7YM1005 石河 真弥

本論文中において以下の略記を用いた.

Ac	: acetyl
Bn	: benzyl
borsm	: based on recovered starting material
Bu	: butyl
calcd.	: calculated
cAMP	: 3',5'-cyclic adenosine monophosphate
c.c.	: column chromatography
COSY	: correlation spectroscopy
Cy	: cyclohexyl
dba	: dibenzylideneacetone
DIPEA	: <i>N,N</i> -diisopropylethylamine
DMF	: <i>N,N</i> -dimethylformamide
DMSO	: dimethyl sulfoxide
EC ₅₀	: 50% effective concentration
EDCI	: 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide
EIMS	: electron ionization mass spectroscopy
Et	: ethyl
FCS	: fetal calf serum
GPC	: gel permeation chromatography
HATU	: <i>O</i> -(7-azabenzotriazol-1-yl)- <i>N,N,N',N'</i> -tetramethyluronium hexafluorophosphate
HMBC	: heteronuclear multiple bond correlation
HMPA	: <i>N,N,N',N',N'',N''</i> -hexamethylphosphoric triamide
HMQC	: heteronuclear multiple quantum coherence
HPLC	: high performance liquid chromatography
HR	: high resolution
IC ₅₀	: 50% inhibitory concentration

Me	: methyl
NMR	: nuclear magnetic resonance
ODS	: octadecylsilyl silica gel
RP	: reverse phase
rt	: room temperature
SD	: standard deviation
SEM	: 2-(trimethylsilyl)ethoxymethyl
TBAF	: tetra- <i>n</i> -butylammonium fluoride
THF	: tetrahydrofuran
TLC	: thin layer chromatography
TMS	: tetramethylsilane
Ts	: <i>p</i> -toluenesulfonyl
UV	: ultraviolet
WL	: wave length

目次

緒論	1
本論	
第 1 章 細胞性粘菌 <i>Polysphondylium tenuissimum</i> の子実体の成分探索	
第 1 節 Pt-1~5 の単離	9
第 2 節 Pt-1 の構造解析	11
第 3 節 Pt-2 の構造解析	14
第 4 節 Pt-3 の構造解析	17
第 5 節 Pt-4 の構造解析	20
第 6 節 Pt-5 の構造解析	23
第 7 節 考察	27
第 2 章 <i>Polysphondylium</i> 属の細胞性粘菌より得られた化合物の合成と生物活性	
第 1 節 Ppc-1 の合成	31
第 2 節 Pt-1 の合成	33
第 3 節 Pt-3 の合成	34
第 4 節 Pt-4 の合成	35
第 5 節 Pt-5 の合成	37
第 6 節 Ppc-1 および Pt-1~5 の生物活性	38
第 3 章 DIF-1 誘導体の合成と生物活性	
第 1 節 DIF-1 誘導体の合成	43
第 2 節 DIF-1 誘導体の生物活性	47
第 3 節 考察	51
結語	52
実験の部	54
参考文献	85
謝辞	88

緒論

創薬における天然物化学の役割は非常に大きく、様々な生理活性物質が植物や微生物などの天然資源から単離され、医薬品やそのリード化合物として利用されている。しかし、現在までに多くの天然資源の成分が探索されており、既存の天然資源から新規生理活性物質を見つけることは困難だと考えられる。また、ハイスループットスクリーニングやコンビナトリアルケミストリーを駆使した創薬が主流になりつつある現在において、天然物化学の有用性を確保するためには、全く新たな天然資源の開拓が必要である。

細胞性粘菌は広く土壌中に生息し、他の生物にない独特な生活環を有する興味深い生物である (Figure 1)。まず孢子から発芽すると、大腸菌などを餌としながら分裂により増殖する単細胞の粘菌アメーバとなる。そして、周囲に餌がなくなり飢餓状態に陥った細胞は走化性物質である cAMP を分泌し、約 10 万個程度の粘菌アメーバが集合して多細胞の集合体を形成する。やがて集合体は移動体となり、予定柄細胞・予定孢子細胞へと分化し、最終的には飢餓状態に陥ってから約 24 時間で多細胞性の柄に孢子塊を頂生した子実体を形成する。このように細胞性粘菌は単純で時間的に短い生活環の中で、単細胞と多細胞、植物的性質と動物性性質といった二つの異なる性質を併せ待っており、生物学の分野においては発生・分化・細胞運動に関するモデル生物として広く用いられている。¹⁾

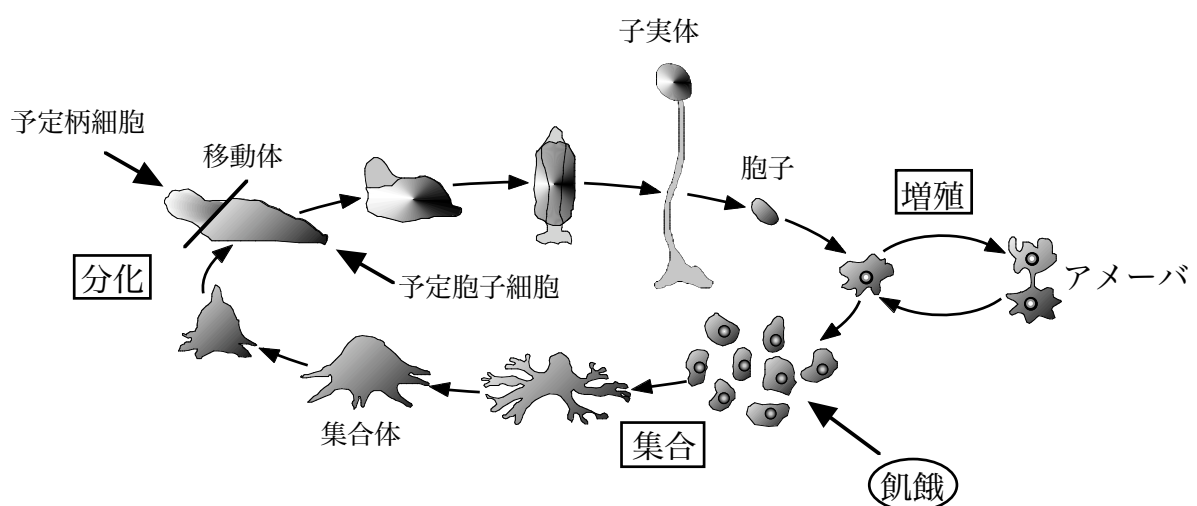


Figure 1. Life cycle of cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*.

これまでに、細胞性粘菌からはいくつかの生物活性成分が単離されている (Figure 2). Discadenine (1)² は、胞子の分散を均一にするためにその濃度の高い条件下で胞子の発芽を抑制する物質である。Glorin (2)³ は、細胞性粘菌 *Polysphondylium violaceum* が飢餓状態に陥った際、粘菌アメーバを集合させる走化性物質である。DIF-1 (3)⁴ は、分化の過程において単一細胞から柄細胞への分化を誘導する因子として知られている。また、AB0022A (4)⁵ は抗菌物質として単離されており、DIF-1 (3)⁴ が重合して形成されたと思われるジベンゾフラン骨格を有している。しかし、これら以外の細胞性粘菌が産生する低分子化合物に関する研究はほとんどなされていなかった。

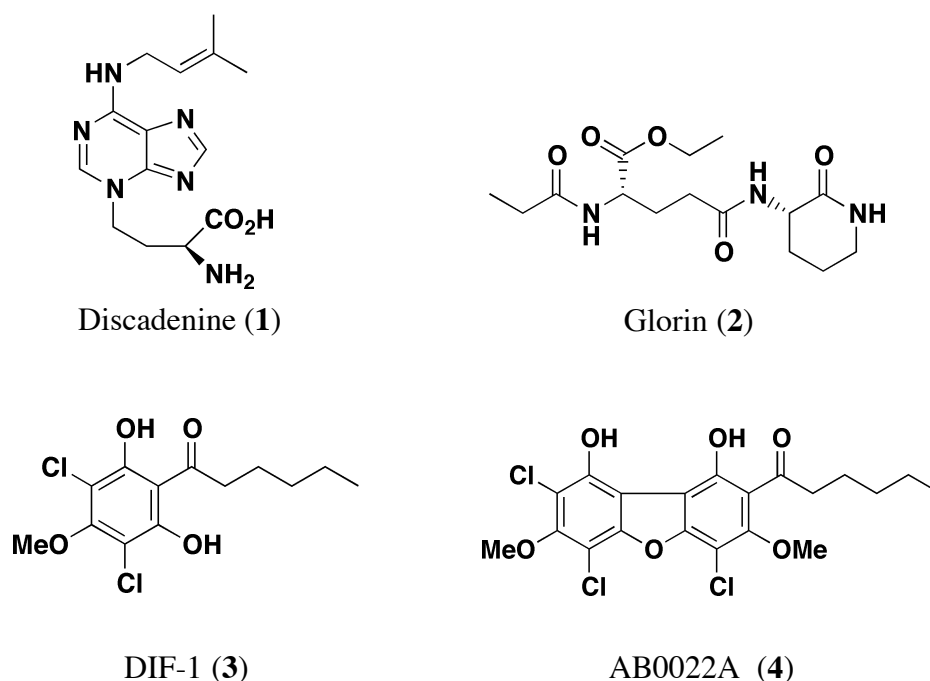


Figure 2. Known compounds isolated from cellular slime molds.

そこで当研究室では細胞性粘菌を新たな天然資源としてとらえ、これまでに十数種の *Dictyostelium* 属および数種の *Polysphondylium* 属の細胞性粘菌について大量培養を行い子実体のメタノール抽出物より成分探索を行ってきている。そして *Dictyostelium* 属の細胞性粘菌より dictyopyrone A~D (5~8)⁶, *D. medium* より dictyomedin A (9), B (10)⁷, *D. discoideum* より furanodictine A (11), B (12)⁸, *D. purpureum*, *D. discoideum* よりそれぞれ dictyoglucosamine A (13), B (14)⁹, *D. brefeldianum* および *D. giganteum* より brefelamide (15)¹⁰, *D. mucoroides* より

ところで細胞性粘菌は，子実体の柄の形態により，*Acytostelium* (アキトステリウム属)，*Dictyostelium* (タマホコリカビ属)，*Polysphondylium* (ムラサキカビモドキ属) の 3 属に分類される (Figure 5).¹⁴ それぞれの特徴は，*Acytostelium* 属の細胞性粘菌は子実体の柄に細胞がなく中空になっていること，*Dictyostelium* 属の細胞性粘菌の柄は分岐しないかまたは不規則に分岐して側生すること，*Polysphondylium* 属の細胞性粘菌の柄は規則的に分岐して輪生することである．これまでに細胞性粘菌は 90 種以上が知られているが，その多くは *Dictyostelium* 属に分類されており，他の属は数が少ない．

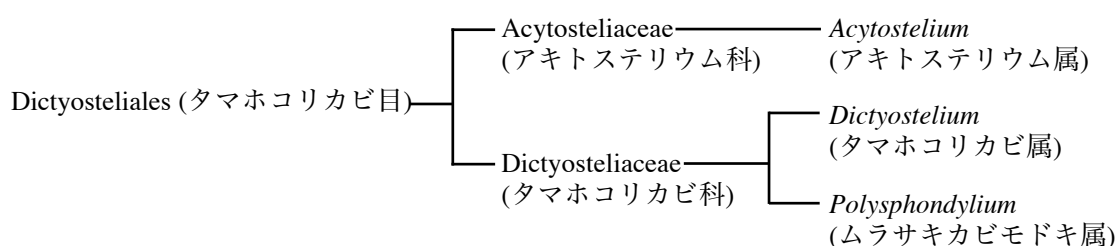


Figure 5. Taxonomy of cellular slime molds.

これまでに当研究室の研究で扱ってきた細胞性粘菌のほとんどは *Dictyostelium* 属に分類され，そこから多くの新規化合物が得られている．一方，他の属の細胞性粘菌についてはほとんど研究が行われていないが，*Dictyostelium* 属の細胞性粘菌とは柄の形態が大きく異なることから，生合成についても大きく異なっている可能性がある．つまり，これまでに得られた化合物とは異なる新規化合物が得られると考えられ，実際に *Polysphondylium filamentosum* より 1 種，*Polysphondylium pseudo-candidum* より 2 種の新規化合物の単離に成功している.^{12, 13}

そこで本研究では，さらなる新規化合物の探索を目的として，*Polysphondylium* 属の 1 種である細胞性粘菌 *Polysphondylium tenuissimum* の大量培養を行い，その子実体のメタノール抽出物に含まれる成分について検討を行った．その結果，新規化合物として Pt-1~5 (19~23) が得られた (Figure 6)．第 1 章では，その構造解析の過程について述べる．

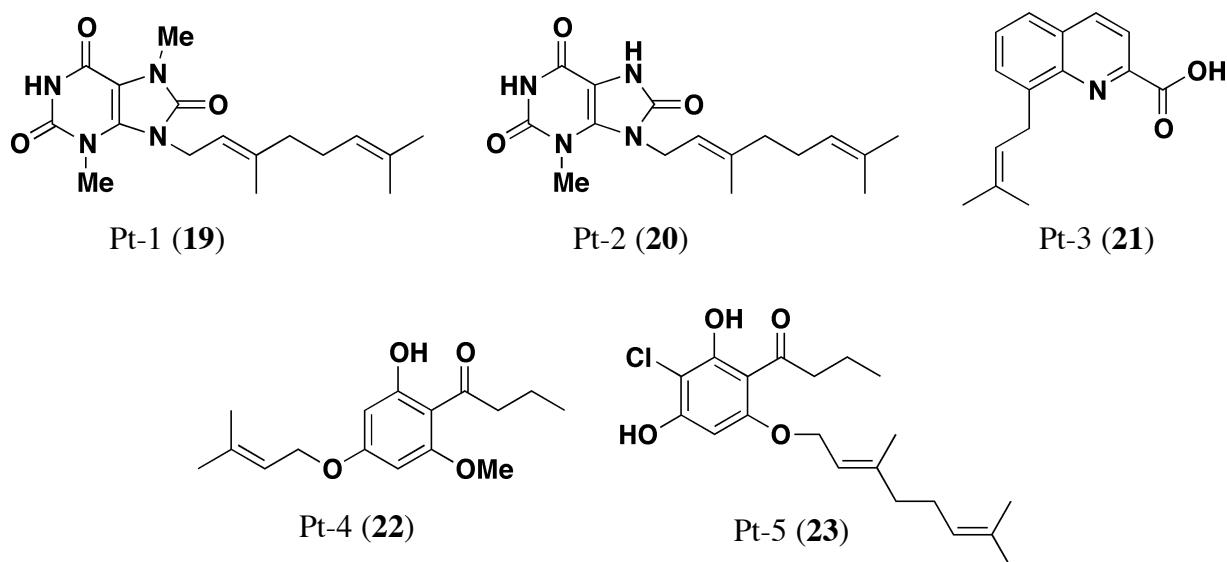


Figure 6. Compounds from *Polysphondylium tenuissimum*.

また、*Polysphondylium* 属の細胞性粘菌より得られた化合物のうち、活性試験に供するために Ppc-1 (18), Pt-1 (19), Pt-3~5 (21~23) の合成を行った。第 2 章ではその合成方法および Ppc-1 (18), Pt-1~5 (19~23) の生物活性試験の結果について述べる。

ところで、細胞性粘菌の柄細胞分化には cAMP と differentiation-inducing-factors (DIFs) が必要であることが知られている。¹⁵ 細胞性粘菌が産生する DIFs として *D. discoideum* の培養液から DIF-1 (3), DIF-2 (24), DIF-3 (25) が単離・同定されている (Figure 7). DIF-1 (3) は EC₅₀ が 0.18 nM と DIFs の中で最も活性が高く、¹⁶ 細胞内遊離カルシウム濃度を上昇させることでその作用を発現していることが示唆されているが、¹⁷ 詳細なメカニズムについては明らかとなっていない。DIF-2 (24) は細胞性粘菌の産生する DIFs のなかで 2 番目に柄細胞分化誘導作用の強い物質であり、柄細胞分化よりも初期の発生において作用していることが示唆されている。¹⁸ DIF-3 (25) は DIF-1 (3) の塩素原子が 1 つ消失した化合物であり、その柄細胞分化誘導作用は DIF-1 (3) の約 4% である。また、いくつかの DIF-1 誘導体が合成されているが、DIF-1 (3) よりも強力な柄細胞分化誘導作用を示す化合物は見出されていない。¹⁶

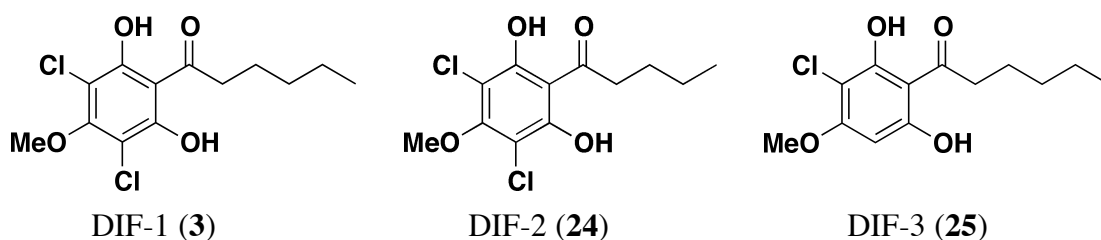


Figure 7. Structures of differentiation inducing factors.

また、DIF-1 (3) と構造が非常に類似した化合物として、differanisole A (26) が知られている (Figure 8).¹⁹ Differanisole A (26) はマウス赤芽球性白血病 B8 細胞に対する再分化誘導作用 (ヘモグロビン産生能) を指標にしたスクリーニングにより、土壌真菌の一種である *Chaetomium* sp. (RB001) から単離された。

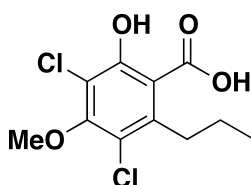


Figure 8. Structure of differanisole A (26).

DIF-1 (3) と differanisole A (26) の構造が類似していることから、これらの化合物が同様の作用を示す可能性が示唆され研究が行われた。*D. discoideum* 野生株の粘菌アメーバは、cAMP 存在下で培養すると自らが産生する DIFs の作用によって 90% 以上の細胞が柄細胞に分化する。また DIF 産生に欠陥のある突然変異株 *D. discoideum* HM44 は、同じ条件下では柄細胞に分化できないが、外部から DIF-1 (3) を与えればその濃度に応じた数の細胞が柄細胞に分化できる。²⁰ この培養系を用いることで、外部から加えた物質に柄細胞分化誘導作用 (DIF 様活性) があるか否かを定量的に検定できる。この系を用いて differanisole A (21) の DIF 様活性を検討した結果、0.01~1 mM の間で濃度依存的に柄細胞分化を誘導し、EC₅₀ はおよそ 0.1 mM であった。²¹ さらに、DIF-1 (3) の B8 細胞やヒト白血病 K562 細胞に対する作用を調べた結果、B8 細胞に対しては 6.5 μM 以上、K562 細胞に対しては 20 μM 以上の濃度において再分化誘導作用や増殖抑制作用を示すことが判明した。²² その後の研究により、DIF-3 (25) も濃度依存的に腫瘍細胞の再分化誘導作用や増殖抑制作用を示すことが明らかとなり、その作用は DIF-1 (3) よりも強いことが知られている。²³

このように、細胞性粘菌の産生する柄細胞分化誘導因子が哺乳類腫瘍細胞の分化に対して作用し、また真菌の産生する二次代謝産物が腫瘍細胞の再分化や粘菌細胞の柄細胞分化を誘導するということから、粘菌柄細胞分化と腫瘍細胞再分化との間に何らかの共通のメカニズムが存在し、DIF-1 (3) と differanisol A (26) に共通の構造を持つ化合物が、種を越えて細胞分化に重要な役割を演じている可能性が示唆された。

そこで、当研究室ではこれまでに細胞分化機構解明の為に分子プローブや、新規抗腫瘍薬の開発を目的として、DIF-1 (3) の誘導体の開発を進めてきた。^{13, 24} 具体的には DIF-1 (3) をメトキシ基、芳香環部位、アシル基に分けそれぞれの部位を変換した誘導体を合成し、その粘菌柄細胞分化誘導活性および腫瘍細胞増殖抑制活性について検討が行われた。

すなわち、メトキシ基については他のアルコキシ基に変換することで、芳香環部位については塩素原子を他のハロゲンに、フェノール性水酸基をメトキシ基に変換することで、またアシル基についてはその鎖長とかさ高さを変えて構造活性相関が行われている。しかし、DIF-1 (3) カルボニル基を他の官能基に変換した化合物はこれまでに合成しておらず、検討が不十分であった (Figure 9)。

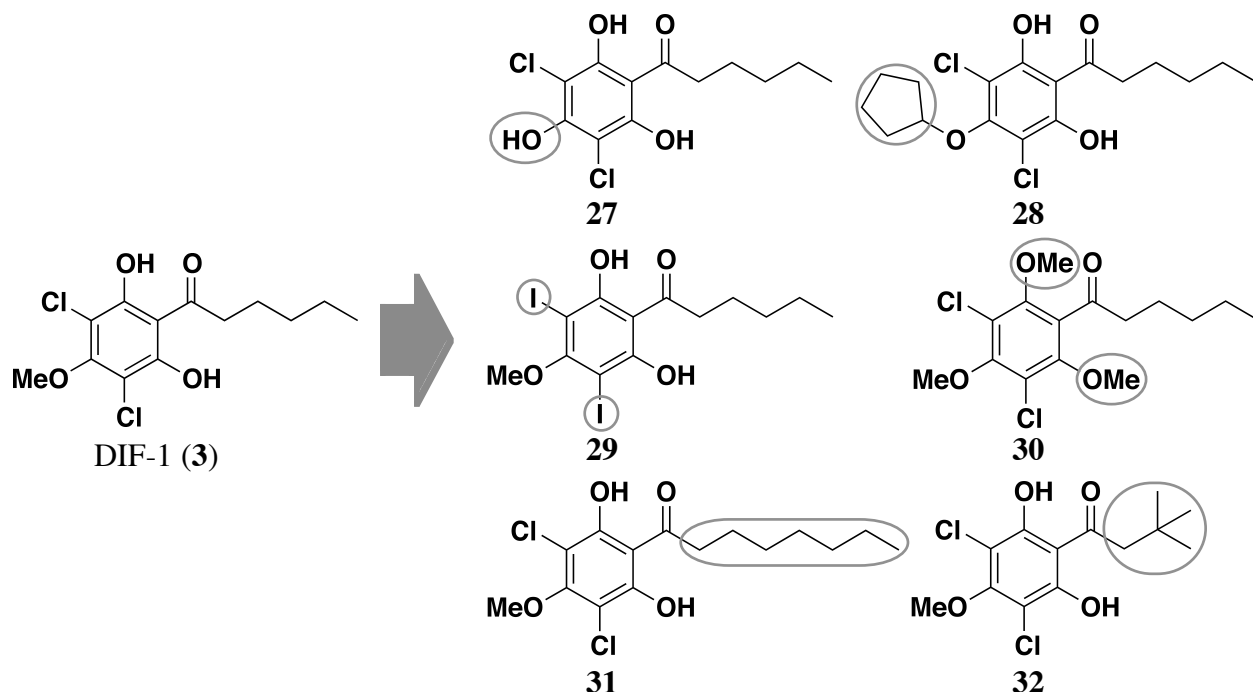


Figure 9. Structures of DIF-1 derivatives.

また近年、DIF-1 (3) の正常細胞に対する作用の研究が行われ、DIF-1 (3) が 3T3-L1 マウ

ス線維芽細胞に対して、細胞数や形態には影響を及ぼさず、糖の取り込みを促進することが明らかとなった。²⁵ このことは、DIF-1 (3) が新たな糖尿病治療薬として利用できる可能性を示唆している。実際にこの作用は KK-Ay 糖尿病モデルマウスに対する腹腔内投与実験でも効果が証明されている。²⁶

そこで本研究では DIF-1 (3) のカルボニルに着目した誘導体の創製を行うこととした。具体的には DIF-1 (3) のカルボニルを還元し水酸基にした誘導体、アシル基をアミド基およびエステル基に変換した誘導体を合成し、粘菌柄細胞分化誘導作用、腫瘍細胞増殖抑制作用および糖取り込み促進作用に対する構造活性相関について検討した (Figure 10).²⁷ その詳細について第 3 章で述べる。

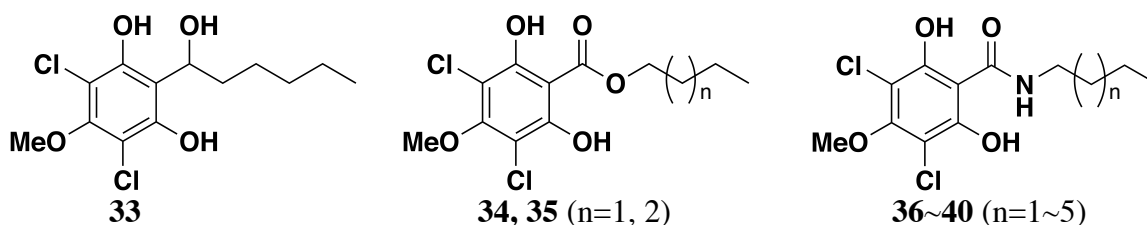
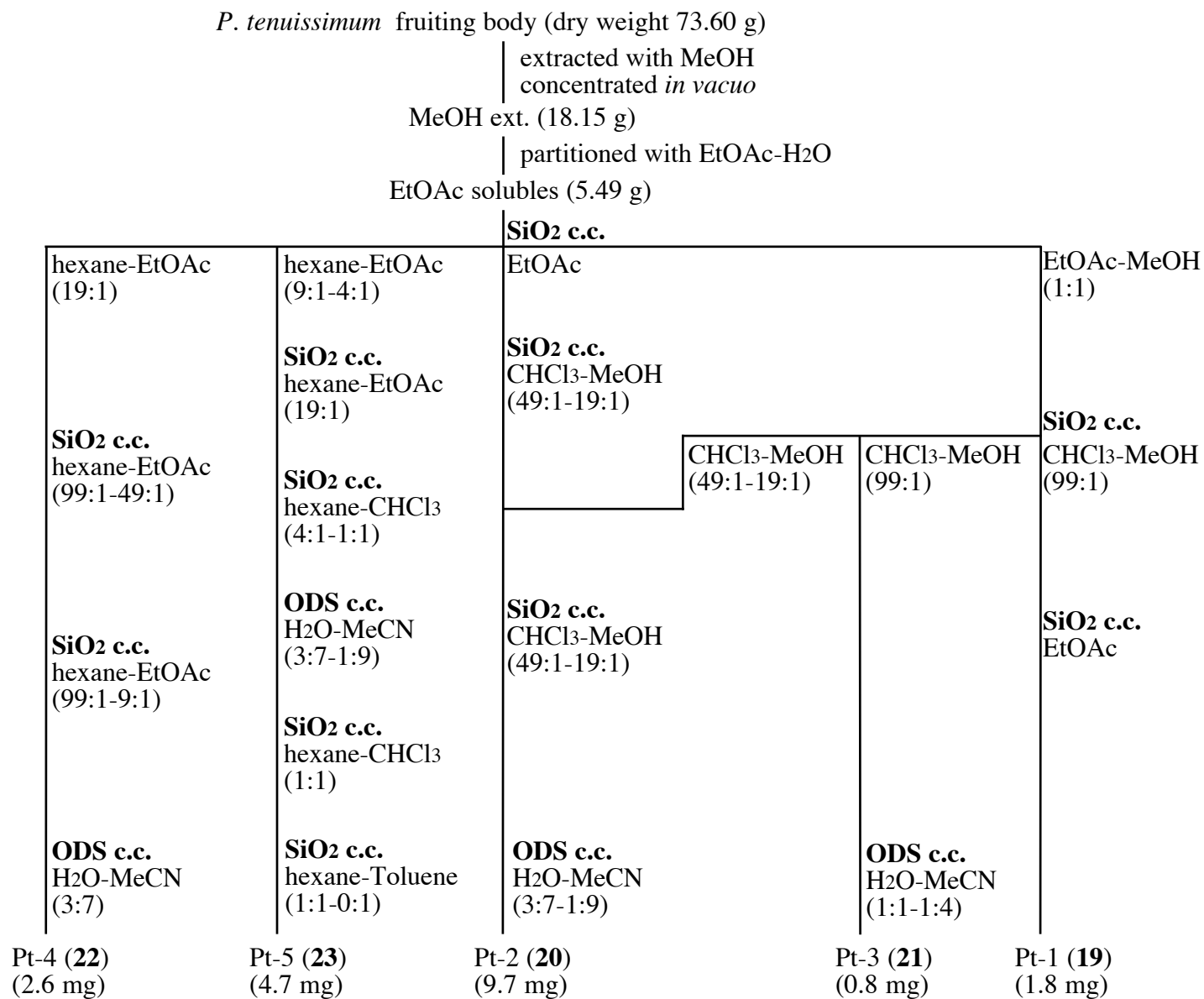


Figure 10. Structures of novel DIF-1 derivatives.

第 1 章 *Polysphondylium tenuissimum* の子実体の成分探索

第 1 節 Pt-1~5 の単離

細胞性粘菌 *Polysphondylium tenuissimum* を直径 15 cm のペトリシャーレ 1255 枚分培養し，子実体を回収，凍結乾燥させた (乾燥重量：73.60 g). これをメタノールで抽出し，得られた抽出物 (18.15 g) を水と酢酸エチルにより分配して酢酸エチル可溶画分 (5.49 g) を得た．これをシリカゲルカラムクロマトグラフィーおよび ODS カラムクロマトグラフィーを用いて分画した結果，Pt-1 (**19**) (1.8 mg), Pt-2 (**20**) (9.7 mg), Pt-3 (**21**) (0.8 mg), Pt-4 (**22**) (2.6 mg) および Pt-5 (**23**) (4.7 mg) をそれぞれ得た (Figure 11).

Figure 11. Isolation procedure of Pt-1~5 (**19~23**).

第2節 Pt-1 の構造解析

Pt-1 (**19**) は無色不定形固体として得られ、HREIMS にて m/z 332.1835 にピークが観測されたことから、分子式 $C_{17}H_{24}N_4O_3$ と推定した。また、 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC スペクトルより、7 個の 4 級 sp^2 炭素、2 個のメチン sp^2 炭素、1 個の窒素に結合したメチレン炭素、2 個のメチレン炭素、2 個の窒素原子に結合したメチル炭素、3 個のメチル炭素の存在が明らかとなった。また、 1H NMR における δ 8.08 の幅の広いシグナルから、フェノール性水酸基または複素環を形成している窒素に結合した水素の存在が示唆された。

次に、 1H - 1H COSY における相関より、C-1' と C-2' の結合および C-4' から C-6' の結合が明らかとなった (Figure 12)。さらに、HMBC スペクトルにおける、C-2', 3', 4' から H-9' に対しての相関と、C-6', 7', 8' から H-10' に対しての相関よりゲラニル基の存在が判明した (Figure 12)。

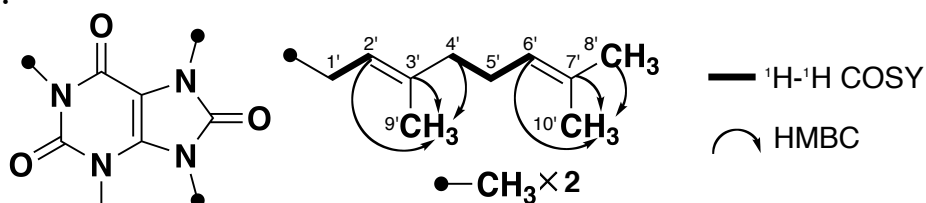


Figure 12. Partial structures of Pt-1 (**19**).

Pt-1 (**19**) からゲラニル基、2 個のメチル基を除いた部分の分子式は $C_5HN_4O_3$ となる。このうち 5 個の炭素原子はいずれも 4 級であり、 ^{13}C NMR における化学シフト (δ 152.6, 151.8, 149.7, 137.1, 99.7) より複素芳香環を構成していることが考えられた。この 5 個の炭素原子と 4 個の窒素原子で複素環を形成し、かつカルボニル基を有する化合物としては、キサンチン骨格の C-8 に酸素が結合した化合物である尿酸誘導体を推定した。そこで、Pt-1 (**19**) の ^{13}C NMR を尿酸²⁸ の文献値と比較したところ、C-5 では 2.6 ppm の差が見られたもののそれ以外ではいずれも 1 ppm 以内の差でありほぼ一致していた (Table 1)。よって、Pt-1 (**19**) は尿酸の窒素原子に 2 個のメチル基、およびゲラニル基が結合した化合物であると判明した。

Table 1. ^{13}C NMR spectral data of Pt-1 (**19**)^a and uric acid²⁸.

positions	Pt-1 (ppm)	Uric acid (ppm)	$\Delta[(\text{Pt-1})-(\text{uric acid})]$
2	149.7	150.1	-0.4
4	137.1	136.6	0.5
5	99.7	97.1	2.6
6	152.6	153.4	-0.8
8	151.8	152.6	-0.8

^a150 MHz in CDCl₃.

最後に、HMBC スペクトルにおける C-5 および C-8 から N-7 に結合したメチル基への相関、C-8 および C-4 からゲラニル基の H-1' への相関、C-4 および C-2 から N-3 に結合したメチル基への相関が明らかとなったことから、Pt-1 (**19**) は 3, 7 位にメチル基、9 位にゲラニル基が結合した尿酸誘導体であることが決定した (Figure 13) .

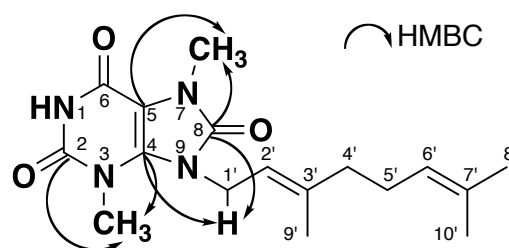


Figure 13. Structure of Pt-1 (**19**).

Table 2. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of Pt-1 (**19**).^a

positions	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
2	149.7	
4	137.1	
5	99.7	
6	152.6	
8	151.8	
1'	41.8	4.66 (2H, d, $J = 6.0$ Hz)
2'	119.4	5.10 (1H, m)
3'	140.7	
4'	39.2	2.03 (2H, t, $J = 7.2$ Hz)
5'	26.1	2.07 (2H, q, $J = 7.2$ Hz)
6'	123.3	5.00 (1H, m)
7'	132.3	
8'	25.7	1.64 (3H, d, $J = 1.0$ Hz)
9'	16.7	1.72 (3H, d, $J = 1.0$ Hz)
10'	17.7	1.56 (3H, s)
1-NH		8.08 (1H, br.s)
3-NMe	30.5	3.61 (3H, s)
7-NMe	29.3	3.56 (3H, s)

^a600 MHz for ^1H NMR and 150 MHz for ^{13}C NMR in CDCl_3 .

第3節 Pt-2 の構造解析

Pt-2 (**20**) は無色不定形固体として得られ、HREIMS にて m/z 318.1688 にピークが観測されたことから、分子式 $C_{16}H_{22}N_4O_3$ と推定した。また、 1H NMR, ^{13}C NMR スペクトルは Pt-1 (**19**) と非常に類似していたが、異なる点として、 1H NMR において 2 個の窒素に結合したメチル基のシグナル (δ 3.61, 3.56) が 1 個になり (δ 3.68), 代わりに幅の広い 1 個のプロトンのシグナル (δ 8.08) が 2 個に増加していた (δ 13.40, 13.29)。そのため、Pt-2 (**20**) は尿酸骨格に 1 個のメチル基とゲラニル基が結合した化合物であることが判明した。

次に、HMBC スペクトルより、C-4 からメチル基およびゲラニル基の H-1' の両方に相関が観測されたことから、N-3 と N-9 のいずれかにメチル基とゲラニル基がそれぞれ結合した化合物であることが明らかとなった。一方、C-2 および C-8 に相当すると考えられるカルボニル炭素 (δ 153.2, 151.5) からは、それぞれメチル基あるいはゲラニル基の H-1' に相関がみられた。しかし、このカルボニル炭素の化学シフトはほぼ同じ値であり、C-2 および C-8 のどちらの炭素由来のシグナルか区別することができない。よってメチル基およびゲラニル基の置換部位を特定することは不能であり、このままでは Pt-2 (**20**) の構造は Figure 14 に示す A または B の構造のいずれかであるか判断することができなかった。

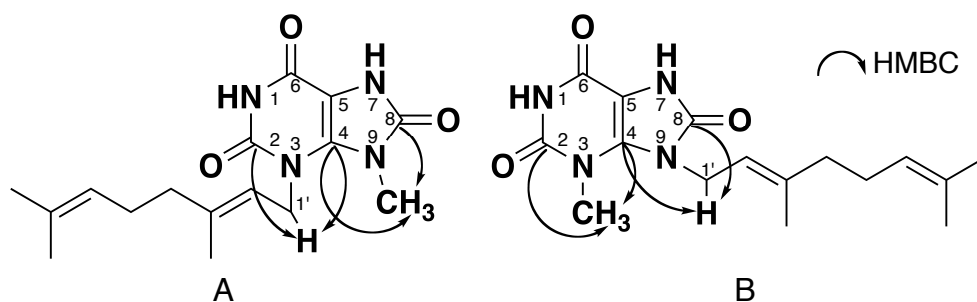
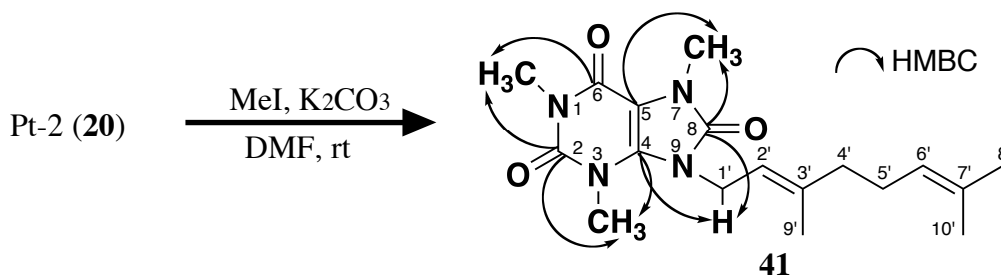


Figure 14. Presumed structures of Pt-2 (**20**).

ところで、N-3 および N-9 に結合した置換基とは異なり、前節で述べた Pt-1 (**19**) の N-7 に結合したメチル基は、HMBC スペクトルにおいて、C-5 (δ 99.7) および C-8 (δ 151.8) から相関が観測される。このうち C-5 はキサンチン骨格中でも最も高磁場側に観測され、そのシグナルを他のシグナルと明確に区別することが可能である。そのため N-7 に結合した

メチル基からの HMBC スペクトルの相関により Pt-1 (**19**) においては C-8 のシグナルについても容易に識別することができた。そこで Pt-2 (**20**) の N-7 にメチル基を導入し、このメチル基からの HMBC スペクトルの相関により C-8 のシグナルを識別することで、C-2 および C-8 どちらの炭素からメチル基およびゲラニル基の H-1' との相関がそれぞれ観測されているのかを明らかにすることにした。

DMF 中でヨウ化メチルを作用させる²⁹ ことで Pt-2 (**20**) のメチル化を行い、窒素に結合したメチル基が 2 個増加した化合物 **41** を得た (Scheme 1)。その構造解析を行った結果、当初の予定通り HMBC スペクトルにおいて、N-7 に結合したメチル基からの相関により C-8 のシグナルが明らかとなった。また、C-8 からゲラニル基の H-1' との相関、C-2 および C-6 から N-1 に結合したメチル基との相関が明らかとなった。そこで **41** は 1, 3, 7 位にメチル基、9 位にゲラニル基が結合していることが判明した。



Scheme 1. Methylation of Pt-2 (**20**).

よって Pt-2 (**20**) の構造も 9 位の窒素原子にゲラニル基が結合していると考えられ、Pt-2 (**20**) の構造を Figure 15 のように決定した。

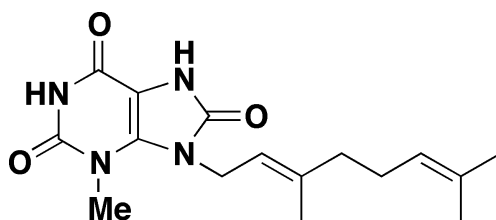


Figure 15. Structure of Pt-2 (**20**).

Table 3. ¹H and ¹³C NMR spectral data of Pt-2 (**20**).^a

positions	¹³ C (ppm)	¹ H (ppm)
2	151.5	
4	137.6	
5	99.8	
6	154.4	
8	153.2	
1'	41.2	4.82 (2H, d, <i>J</i> = 5.7 Hz)
2'	121.4	5.38 (1H, m)
3'	139.5	
4'	39.4	2.05 (2H, t, <i>J</i> = 7.0 Hz)
5'	26.4	2.11 (2H, q, <i>J</i> = 7.0 Hz)
6'	124.3	5.10 (1H, m)
7'	131.8	
8'	25.7	1.63 (3H, d, <i>J</i> = 0.8 Hz)
9'	16.4	1.71 (3H, d, <i>J</i> = 1.0 Hz)
10'	17.7	1.52 (3H, s)
3-NMe	30.0	3.68 (3H, s)
1-NH		13.40 (1H, br.s) ^b
9-NH		13.29 (1H, br.s) ^b

^a600 MHz for ¹H NMR and 150 MHz for ¹³C NMR in pyridine-*d*₅.^bAssignments are interchangeable.

第4節 Pt-3 の構造解析

Pt-3 (**21**) は褐色不定形固体として得られ、HREIMS にて m/z 241.1091 にピークが観測されたことから、分子式 $C_{15}H_{15}NO_2$ と推定した。また、 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC スペクトルより、1 個のカルボニル炭素、5 個の 4 級 sp^2 炭素、6 個のメチン sp^2 炭素、1 個のメチレン炭素、2 個のメチル炭素の存在が明らかとなった。

次に、 1H - 1H COSY における相関より、C-1' と C-2' の結合が明らかとなった。また、HMBC スペクトルにおける、C-2' から H-4' および H-5' に対しての相関、C-3' から H-4' および H-5' に対しての相関から、プレニル基の存在が判明した (Figure 16)。

一方、 1H - 1H COSY における相関より、C-3 と C-4 の結合、および C-5 から C-7 の結合が明らかとなった (Figure 16)。また、HMBC スペクトルにおける C-4a から H-3 および H-6 に対する相関および C-5 から H-4 への相関より、C-4, 4a, 5 の結合が明らかとなった。さらに、C-8 から H-6 および H-7 に対する相関、C-8a から H-4, 5, 7 への相関より、C-4a, 8a, 8, 7 の結合が明らかとなった。次に C-2 から H-4 への相関より C-2 と C-3 の結合が明らかとなった (Figure 16)。また、隣り合う H-3 および H-4 (δ 8.39, 8.26) が通常のベンゼン環のプロトンの化学シフト (δ 7.27) と比べると大きく低磁場側にシフトしていることより、窒素原子を含んだ複素芳香環である、2,8-2 置換キノリン環の存在が示唆された (Figure 16)。さらに、Pt-3 (**21**) からプレニル基および 2,8-2 置換キノリン環を除いた分子式 (CHO_2) と、 ^{13}C NMR におけるシグナル (δ 164.3) より、カルボキシル基の存在を推測した (Figure 16)。

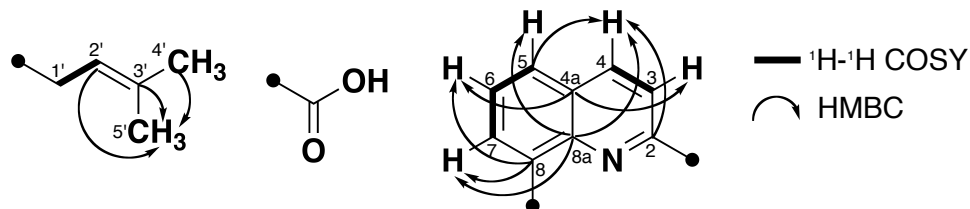


Figure 16. Partial structures of Pt-3 (**21**).

最後に HMBC スペクトルにおける C-7, 8, 8a からプレニル基の H-1' への相関から、8 位にプレニル基が結合していることが明らかとなった。残った置換部位である 2 位にカルボ

キシル基が結合すると考えられ、Pt-3 (**21**) の構造を Figure 17 のように決定した。

決定した構造が正しいことを確認するために、Pt-3 (**21**) の 8 位のプレニル基がエチル基に置換した既知化合物である 8-ethylquinoline-2-carboxylic acid (**42**)³⁰ の文献値と、その ¹³C NMR スペクトルを比較した。すると異なる置換基が結合した C-8 の化学シフトにのみ 2.5 ppm という差が見られたが、他の炭素の化学シフトはほぼ一致していたため、構造が正しいことが支持された (Table 4)。

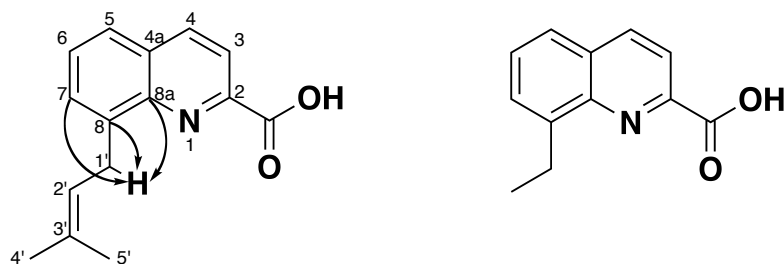


Figure 17. Structures of Pt-3 (**21**) (left) and 8-ethylquinoline-2-carboxylic acid (**42**) (right).

Table 4. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of Pt-3 (**21**)^a and 8-ethylquinoline-2-carboxylic acid (**42**)³⁰.

Pt-3 (21)			8-Ethylquinoline-2-carboxylic acid (42)	
	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)	^{13}C (ppm)	$\Delta[\mathbf{21-42}]$
2	144.7		144.7	0.0
3	118.8	8.26 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	118.8	0.0
4	139.4	8.39 (1H, d, $J = 8.3$ Hz)	139.4	0.0
4a	130.3		130.2	0.1
5	126.0	7.78 (1H, dd, $J = 1.2, 8.1$ Hz)	125.9	0.1
6	129.2	7.62 (1H, dd, $J = 7.1, 8.1$ Hz)	129.3	-0.1
7	130.2	7.65 (1H, dd, $J = 1.2, 7.1$ Hz)	129.5	0.7
8	140.5		143.0	-2.5
8a	144.4		144.3	0.1
1'	30.1	3.97 (2H, d, $J = 7.2$ Hz)	24.4	—
2'	122.2	5.41 (1H, m)	14.8	—
3'	133.4			
4'	25.7	1.76 (3H, br.s)		
5'	17.9	1.80 (3H, br.s)		
2-COOH	164.3		164.5	-0.2

^a600 MHz for ^1H NMR and 150 MHz for ^{13}C NMR in CDCl_3 .

第 5 節 Pt-4 の構造解析

Pt-4 (**22**) は黄褐色不定形固体として得られ、HREIMS にて m/z 278.1498 にピークが観測されたことから、分子式 $C_{16}H_{22}O_4$ と推定した。また、 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC スペクトルより、1 個のケトンカルボニル炭素、5 個の 4 級 sp^2 炭素、3 個のメチン sp^2 炭素、1 個のオキシメチレン炭素、2 個のメチレン炭素、1 個のメトキシ炭素、3 個のメチル炭素の存在が明らかとなった。

つづいて、 1H NMR スペクトルより、メタカップリングしている 2 個の芳香族水素 [δ 6.05 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.92 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)] が観測されたことから、1,2,3,5-4 置換ベンゼンの存在が判明した (Figure 18)。また、低磁場側にあるシグナル (δ 14.09, 1H, s) から、分子内結合したフェノール性水酸基の存在が示唆された。

次に、 1H - 1H COSY における相関より、C-2 から C-4 の結合が明らかとなり、HMBC スペクトルにおける C-1 から H-2 に対しての相関と併せて、ブチリル基の存在が判明した (Figure 18)。また、 1H - 1H COSY における C-1'' から C-2'' への相関と、HMBC スペクトルにおける C-2'' から H-4'' および H-5'' に対しての相関、C-3'' から H-4'' および H-5'' に対しての相関とを併せて、プレニルオキシ基の存在が明らかとなった (Figure 18)。よってこの化合物は 1,2,3,5-4 置換ベンゼンにメトキシ基、水酸基、ブチリル基およびプレニルオキシ基が結合した化合物であると考えられた。

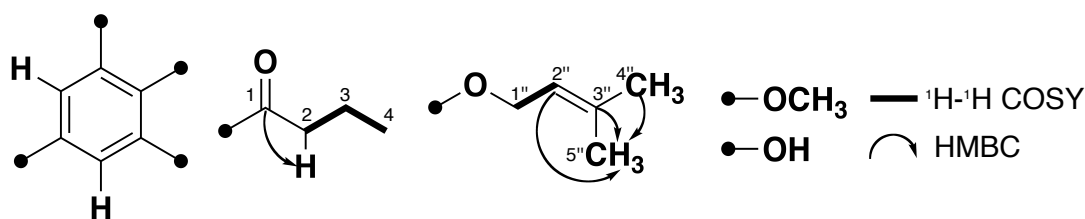


Figure 18. Partial structures of Pt-4 (**22**).

さらに HMBC スペクトルにおいて、C-1', C-2', C-3' からフェノール性水酸基に対する相関が観測された (Figure 19)。このことは C-1', C-2' のいずれかにフェノール性水酸基が結合していることを示唆している。 ^{13}C NMR における化学シフトはそれぞれ δ 105.7, 167.6

であり，より低磁場側にある C-2' にフェノール性水酸基が結合していると考えられる．また，フェノール性水酸基が分子内水素結合していることから C-1' にブチリル基が結合していることが明らかとなった (Figure 19)．また HMBC スペクトルにおいて，C-4' からプレニルオキシ基の H-1'' に対する相関，C-6' からメトキシ基に対する相関がみられたよって，Pt-4 (**22**) は 1' 位にブチリル基，2' 位に水酸基，4' 位にプレニルオキシ基，および 6' 位にメトキシ基が結合した 4 置換ベンゼンであることが判明した．

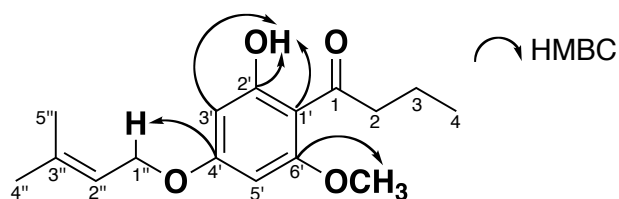


Figure 19. Structure of Pt-4 (**22**).

Table 5. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of Pt-4 (**22**).^a

positions	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1	205.8	
2	46.1	2.94 (2H, t, $J = 7.4$ Hz)
3	18.1	1.67 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz)
4	14.0	0.96 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)
1'	105.7	
2'	167.6	
3'	94.2	6.05 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)
4'	165.0	
5'	91.3	5.92 (1H, d, $J = 2.4$ Hz)
6'	162.7	
1''	65.0	4.50 (2H, d, $J = 6.8$ Hz)
2''	118.7	5.45 (1H, m)
3''	139.3	
4''	25.8	1.78 (3H, s)
5''	18.2	1.72 (3H, s)
2'-OH		14.09 (1H, s)
6'-OMe	55.5	3.82 (3H, s)

^a600 MHz for ^1H NMR and 150 MHz for ^{13}C NMR in CDCl_3 .

第6節 Pt-5 の構造解析

Pt-5 (**23**) は淡黄色不定形固体として得られ、HREIMS にて m/z 366.1597 にピークが観測された。また、LREIMS にて m/z 366, 368 のシグナルが強度比 3:1 という 1 個の塩素原子を含む場合に特徴的な同位体パターンを示していたことから、分子式 $C_{20}H_{27}ClO_4$ と推定した。さらに、 1H NMR, ^{13}C NMR, HMQC スペクトルより、1 個のケトンカルボニル炭素, 7 個の 4 級 sp^2 炭素, 3 個のメチン sp^2 炭素, 1 個のオキシメチレン炭素, 4 個のメチレン炭素, 4 個のメチル炭素の存在が明らかとなった。

次に、 1H NMR における δ 6.13 のシグナル, ^{13}C NMR における 5 個の 4 級 sp^2 炭素のシグナル (δ 162.0, 160.9, 157.5, 106.3, 99.9) および 1 個のメチン sp^2 炭素のシグナル (δ 91.0) から 5 置換ベンゼンの存在が示唆された (Figure 20)。さらに、 1H NMR における δ 14.83 のシグナルから分子内水素結合したフェノール性水酸基の存在が、 δ 6.14 の幅の広いシグナルから、フェノール性水酸基の存在が示唆された (Figure 20)。

また、 1H - 1H COSY および HMBC スペクトルにおける相関より、Pt-1 (**19**) と同様にゲラニルオキシ基の存在、ならびに Pt-4 (**22**) と同様にブチリル基の存在が明らかとなった (Figure 20)。よって、Pt-5 (**23**) はブチリル基, ゲラニルオキシ基, 2 個の水酸基, 1 個の塩素原子が 5 置換ベンゼンに結合した化合物であるということが明らかとなった。

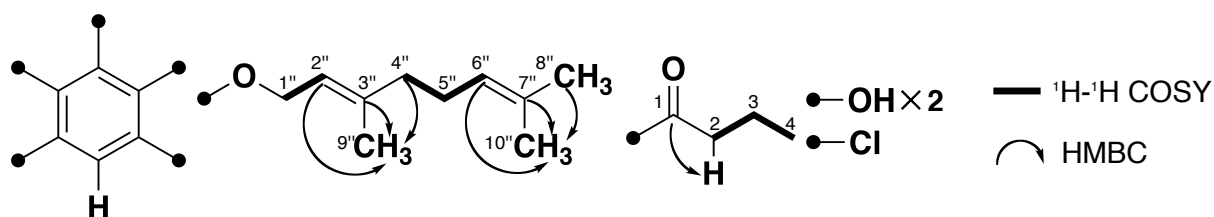


Figure 20. Partial structures of Pt-5 (**23**).

HMBC スペクトルにおいて、C-1', C-2', C-3' から分子内水素結合したフェノール性水酸基に対する相関が観測された (Figure 21)。このことは C-1', C-2', C-3' のいずれかに分子内水素結合したフェノール性水酸基が結合していることを示唆している。3 個の炭素のうち ^{13}C NMR における化学シフトが最も低磁場側にシフトしているのは C-2' (δ 162.0) であることより、C-2' に分子内水素結合したフェノール性水酸基が結合していることが明らかと

なった。また、C-2' のフェノール性水酸基が分子内水素結合していることから、C-1' にブチリル基が結合すると考えられた。次に HMBC スペクトルにおいて H-5' から C-1', 3', 4', 6' へ相関がみられたため、C-5' は分子内水素結合したフェノール性水酸基のパラ位に位置することが明らかとなった。さらに、C-4' および C-6' に相当すると考えられる 4 級 sp^2 炭素 (δ 160.9, 157.5) は化学シフト値から酸素原子が結合していることがわかるので、唯一残った C-3' には塩素原子が結合すると考えられた (Figure 21)。

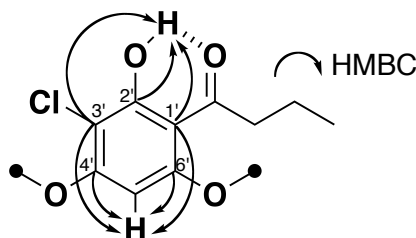


Figure 21. Partial structures of Pt-5 (**23**).

また HMBC スペクトルにおいて、C-4' および C-6' からはそれぞれフェノール性水酸基あるいはゲラニルオキシ基の H-1'' に相関がみられた。しかし、これ以上の情報がないことから、C-4' および C-6' に結合するフェノール性水酸基およびゲラニルオキシ基の置換部位を特定することは不能であった。よって、このままでは Pt-5 (**23**) の構造が Figure 22 に示す **23a** または **23b** の構造のいずれかであるか判断することができなかった。

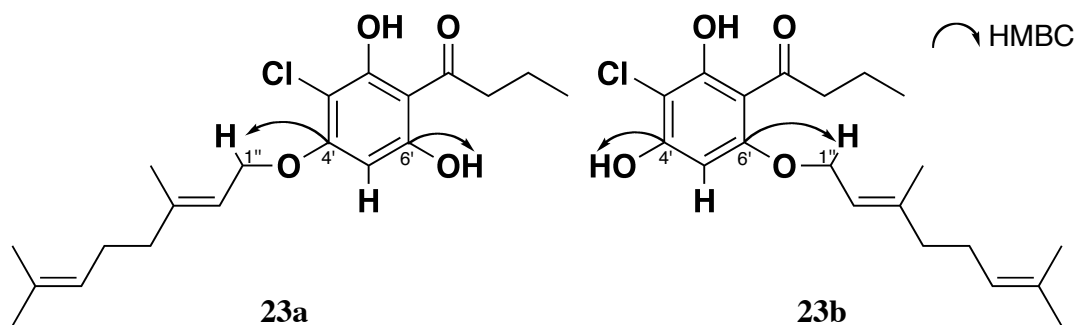
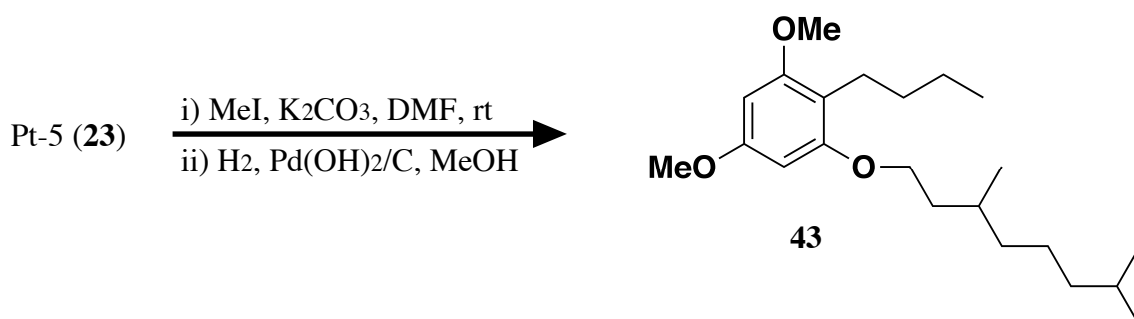


Figure 22. Presumed structures of Pt-5 (**23**).

そこで、塩素原子を除去することで、化合物が C-1', C-4' を軸として対称体になるか否かで Pt-5 (**23**) の構造決定を行うこととした。すなわち **23a** の構造であるならば、塩素原子が除去されれば対称体となるため芳香環上の 2 つのプロトンおよび 2 つのフェノール性水酸基の化学シフト値が同じとなる。また、**23b** の構造であるならば、対称体とならないた

めそれらの化学シフト値は異なる値をとるはずである．ところで Pt-5 (**23**) の様に分子内水素結合をしたフェノール性水酸基がある状態でカルボニル基を還元すると化合物が不安定になることがわかっている (第 3 章にて類似した構造を有する DIF-1 (**3**) のカルボニル基を還元した化合物を合成している)．そのため塩素原子を除去するために接触水素化を行うと途中で化合物が分解する可能性が考えられた．そこでまず，化合物の安定化のために DMF 中でヨウ化メチルを作用させることで 2 個のフェノール性水酸基をメトキシ基へと変換した後，水素雰囲気下，Pd(OH)₂ を触媒として接触水素化を行った．その結果オレフィンおよびカルボニル基の還元，また塩素原子が除去された化合物 **43** を得た (Scheme 2)．



Scheme 2. Methylation and catalytic reduction of Pt-5 (**23**).

得られた化合物 **43** は，2 個のメトキシ基 (δ_{C} : 55.7, 55.3, δ_{H} : 3.79, 3.78) が NMR 上で明確に区別できたため，**23a** より誘導される対称な化合物ではないことが明らかとなり，Pt-5 (**23**) の構造を Figure 23 のように決定した．

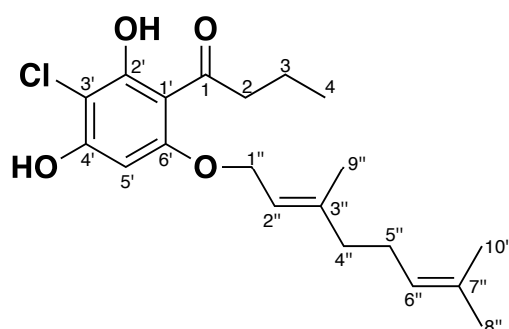


Figure 23. Structure of Pt-5 (**23**).

Table 6. ^1H and ^{13}C NMR spectral data of Pt-5 (**23**).^a

positions	^{13}C (ppm)	^1H (ppm)
1	206.3	
2	46.4	2.99 (2H, t, $J = 7.4$ Hz)
3	18.3	1.68 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz)
4	13.9	0.97 (3H, t, $J = 7.4$ Hz)
1'	106.3 ^b	
2'	162.0	
3'	99.9 ^b	
4'	157.5	
5'	91.0	6.13 (1H, s)
6'	160.9	
1''	65.9	4.58 (2H, d, $J = 6.7$ Hz)
2''	117.9	5.50 (1H, m)
3''	142.7	
4''	39.5	2.08-2.16 (2H, m)
5''	26.2	2.08-2.16 (2H, m)
6''	123.5	5.09 (1H, m)
7''	132.1	
8''	25.6	1.68 (3H, s)
9''	16.7	1.75 (3H, s)
10''	17.7	1.61 (3H, s)
2'-OH		14.83 (1H, s)
4'-OH		6.14 (1H, br.s)

^a600 MHz for ^1H NMR and 150 MHz for ^{13}C NMR in CDCl_3 .^bAssignments are interchangeable.

第7節 考察

本研究で細胞性粘菌 *Polysphondylium tenuissimum* から単離された Pt-1~5 (19~23) は既知の芳香族化合物を母核として、プレニル基やゲラニル基が結合した構造を有しているのが特徴である。緒論で述べた様にこれまでに細胞性粘菌よりプレニル基が結合した芳香族化合物である discadenine (1)² が孢子発芽抑制物質として単離されており、今回単離した化合物についても細胞性粘菌に対する作用が期待される (Figure 24).

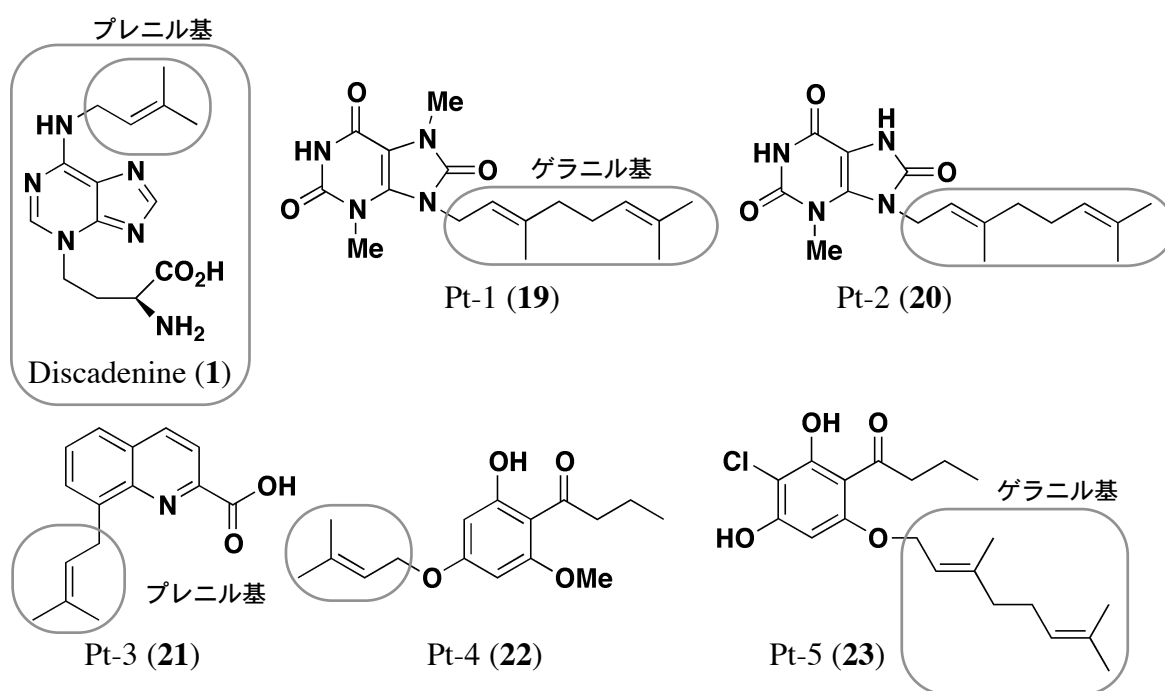


Figure 24. Discadenine (1) and Pt-1~5 (19~23).

また、Pt-1 (19) および Pt-2 (20) は尿酸 (44) の誘導体である。in vitro 試験において、尿酸 (44) の窒素原子がアルキル化された化合物はラジカルの除去による抗酸化作用を有することが知られている。²⁹ したがって尿酸 (44) の窒素原子にゲラニル基やメチル基が結合した Pt-1 (19) および Pt-2 (20) も抗酸化作用を有することが示唆される。

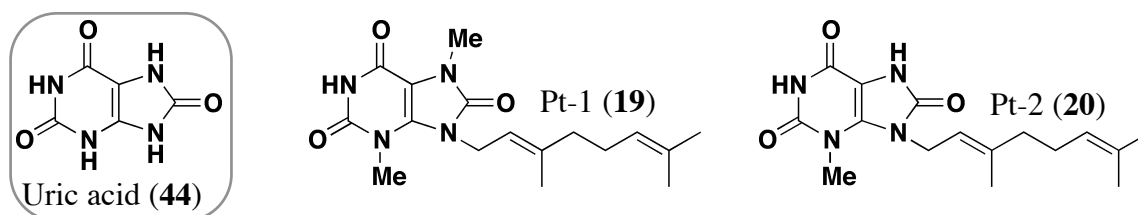


Figure 25. Uric acid (44) and Pt-1 (19) and Pt-2 (20).

また、Pt-3 (**21**) は、quinaldic acid (**45**) の 8 位にプレニル基が結合した化合物である。Quinaldic acid (**45**) は tryptophan (**46**) の異化経路である、キヌレニン-アントラニル酸経路の中間体 kynurenin (**47**) から quinurenic acid (**48**) を経て生合成されることが知られている。³¹ Pt-3 (**21**) はこの quinaldic acid (**45**) がプレニル化されることにより生合成されると推測できる (Figure 26). またこれまでに細胞性粘菌から得られた化合物のうち、brefelamide (**15**)¹⁰ が kynurenin (**47**) から、Ppc-1 (**18**)¹³ が quinurenic acid (**48**) から生合成されていることが予想されており、細胞性粘菌がほかにも tryptophan (**46**) を利用した二次代謝産物を多く産生していることが考えられる (Figure 26).

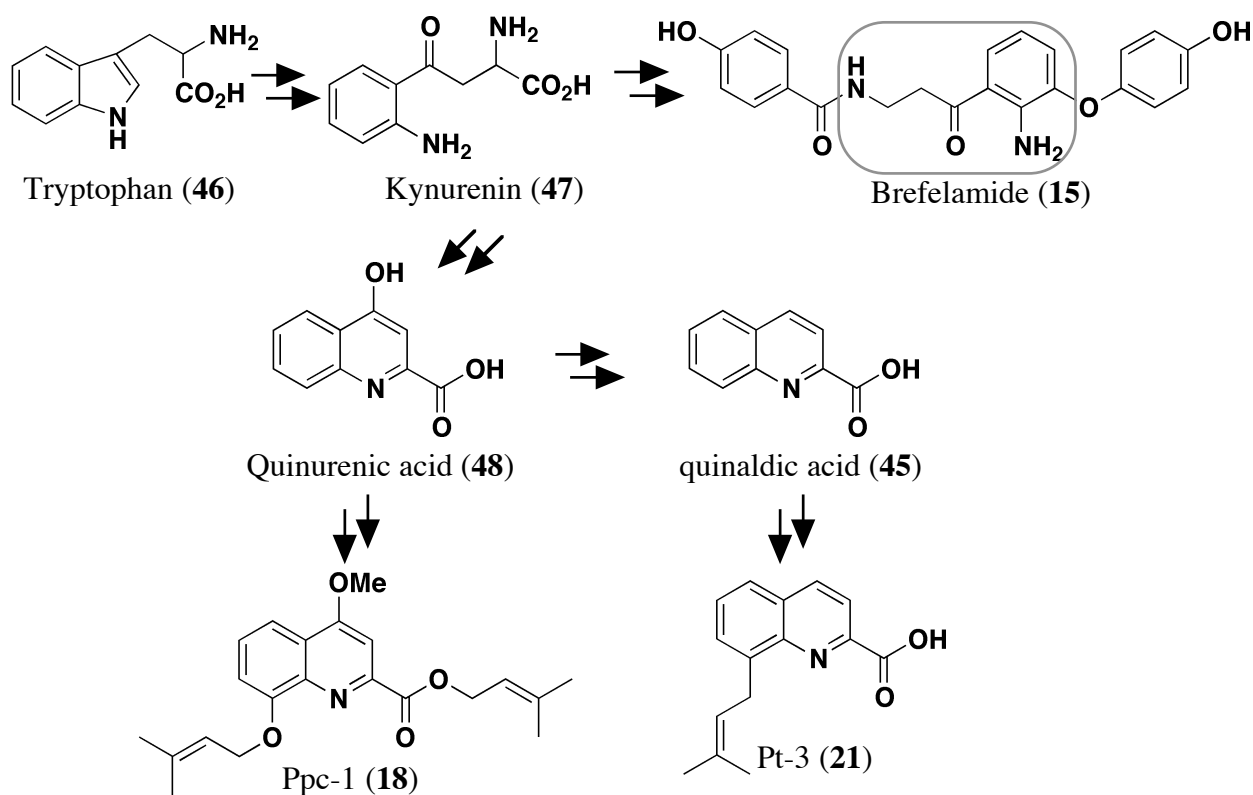
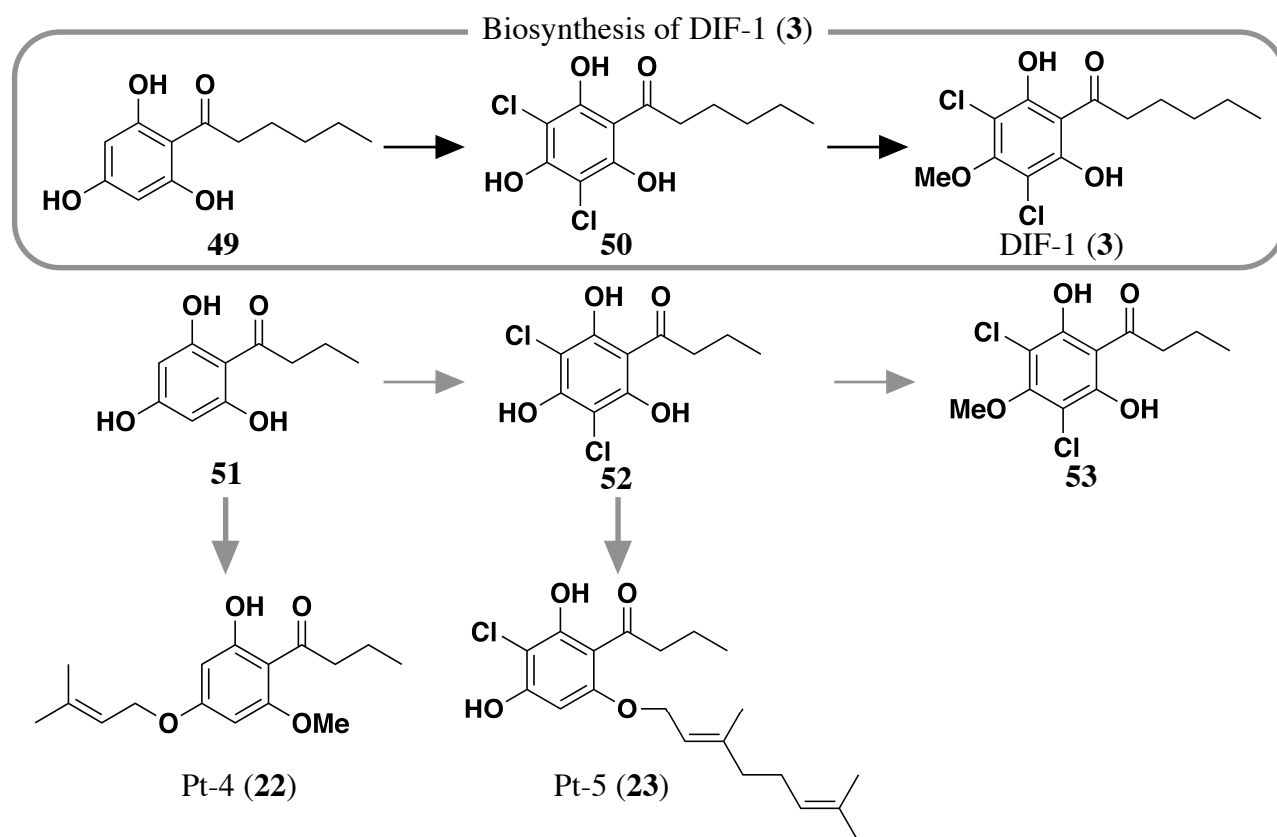


Figure 26. Plausible biosynthesis of Pt-3 (**21**), Ppc-1 (**18**) and brefelamide (**15**).

Pt-4 (**22**) および Pt-5 (**23**) はヘキサノイル基がブチリル基へと変化しているものの、緒論で述べた DIF-1 (**3**) の類縁体である。DIF-1 (**3**) はその前駆体である **49** が塩素化され **50** となり、さらにメチル化されることで生合成されることが知られている。¹したがって子実体の抽出物より得られた Pt-4 (**22**) および Pt-5 (**23**) は、アシル鎖の長さが炭素数 4 の DIF 類縁体から生合成されると推測される (Figure 27). また、緒論で述べた様に DIF-1 (**3**) と DIF-3 (**25**) には、哺乳類腫瘍細胞に対する増殖抑制作用を有することが知られている。^{22, 23}

したがって DIF-3 (25) と同様に塩素原子が 1 個結合した Pt-5 (23) も腫瘍細胞における増殖抑制作用を有していると推測される (Figure 27).



ところで、近年の研究で細胞性粘菌の分類をこれまでの伝統的な形態学的分類ではなく rRNA を用いた系統解析による遺伝学的な分類が試みられている。³² その結果細胞性粘菌は Parvisporids, Heterostelids, Rhizostelids および Dictyostelids の 4 つのグループに分類される。これまでの分類と比較すると *Dictyostelium* 属のうち胞子が小さい群が Parvisporids に、全ての *Acytostelium* 属とほとんどの *Polysphondylium* 属および一部の *Dictyostelium* 属が Heterostelids に、*Dictyostelium* 属のうち一カ所から群生するものが Rhizostelids に、*P. violaceum* と残りの *Dictyostelium* 属の細胞性粘菌が Dictyostelids に分類される。この分類に基づいてこれまでに当研究室扱った細胞性粘菌 20 種を当てはめてみるとその半数以上は Dictyostelids に分類される。他の細胞性粘菌については Heterostelids に分類されるものが 5 種、Parvisporids と Rhizostelids に分類されるものがそれぞれ 1 種ずつであった (Figure 28).

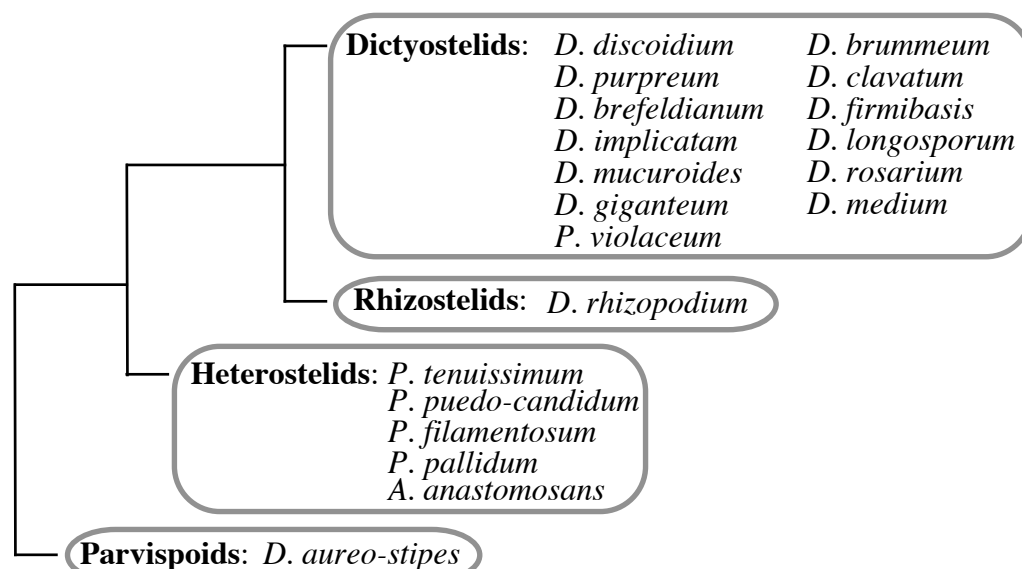


Figure 28. Proposed taxa of cellular slime molds.

これまでに細胞性粘菌より単離された DIF 類縁体を比較してみると Dictyostelids に分類される細胞性粘菌からはアシル鎖が炭素数 6 の DIF 類縁体が, Heterostelids に分類される細胞性粘菌からはアシル鎖が炭素数 4 の DIF 類縁体が単離されていることがわかる (Figure 29).

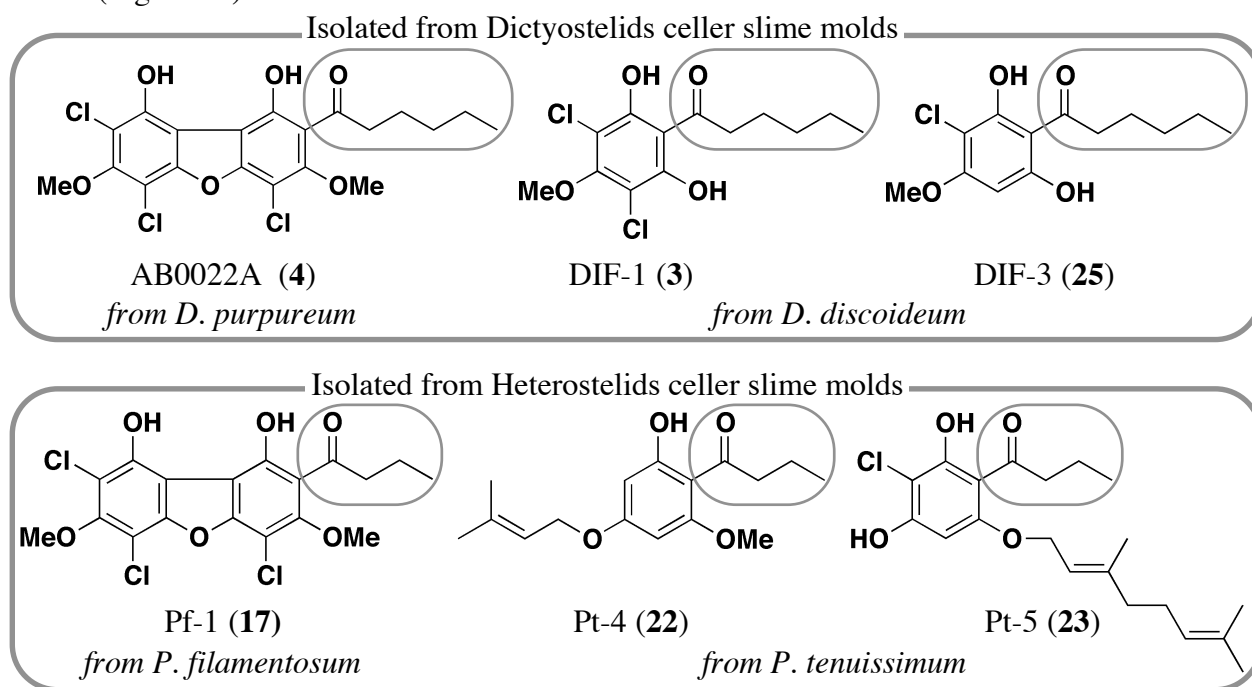


Figure 29. DIF derivatives from cellular slime molds.

このことから Dictyostelids と Heterostelids とでは遺伝子レベルで DIF 類縁体の炭素鎖長を決定する要因が異なっている可能性も考えられる。今後さらに両分類に属する細胞性粘菌の成分研究を行うことで説明が期待される。

第 2 章 *Polysphondylium* 属の細胞性粘菌より単離された化合物の合成と生物活性

第 1 章で単離した Pt-1~5 (**19**~**23**) は、Pt-2 (**20**) を除いて 5 mg 以下しか単離できず生物活性試験に供するには量が不十分であった。そこで Pt-1 (**19**), Pt-3~5 (**21**~**23**) を合成することで増量することにした。また以前に *Polysphondylium pseudo-candidum* より単離された微量化合物である Ppc-1 (**18**)¹³ も Pt-3, 4 (**21**, **22**) と同じくプレニル基が結合した芳香族化合物であるためあわせて合成を行うこととした。

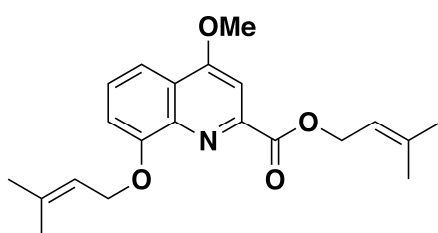
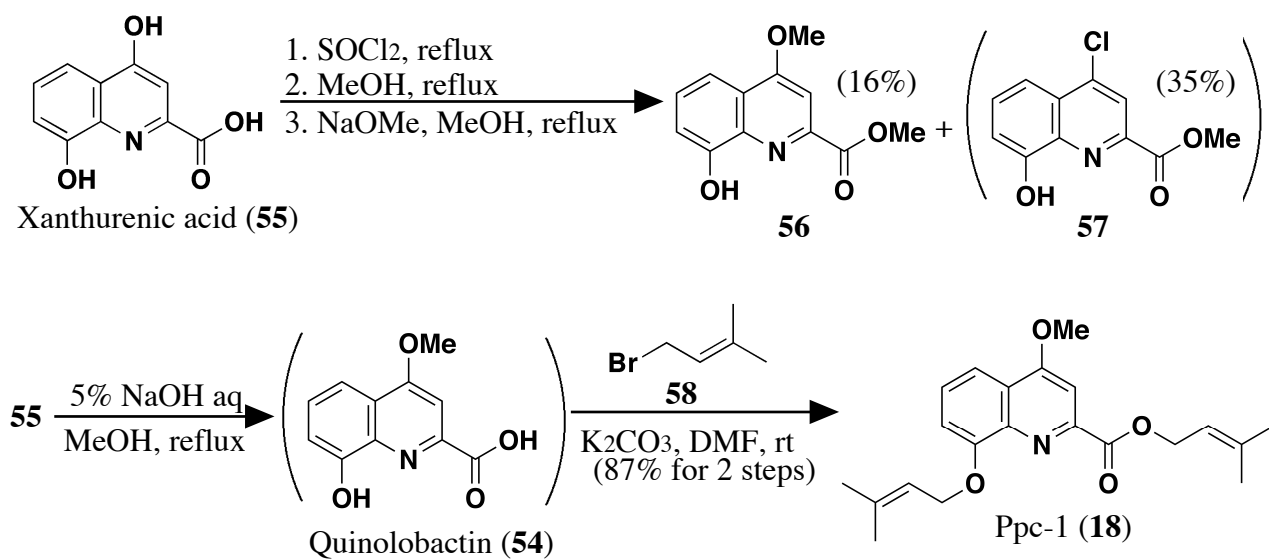


Figure 30. Structure of Ppc-1 (**18**).

第 1 節 Ppc-1 の合成

Ppc-1 (**18**) の様に、2, 4 および 8 位が置換されたキノリン誘導体として、蛍光菌 *Pseudomonas fluorescens* より quinolobactin (**54**) が単離されている。³³ Ppc-1 (**18**) は quinolobactin (**54**) の 2 位のカルボキシル基と、8 位の水酸基にプレニル基が結合した化合物であるため、すでに確立されている quinolobactin (**54**) の合成法³⁴ を利用した。

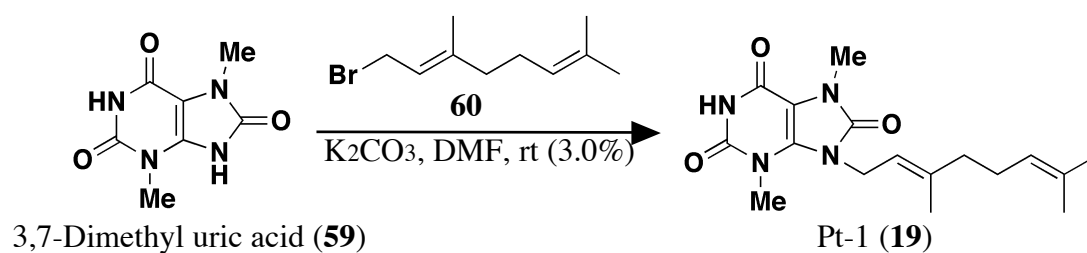
まず、xanthurenic acid (**55**) を thionyl chloride で加熱還流し溶媒を留去し、つづいて MeOH で加熱還流した。さらに NaOMe を作用させることで quinolobactin (**54**) のメチルエステル体 **56** を得た。収率は 16% と非常に悪かったが、これは中間体と考えられる **57** が反応しきらなかったためであると考えられる。予備的な結果ではあるが **57** に NaOMe を作用させても目的物である **56** は生成しなかった。続いて **56** を加水分解し quinolobactin (**54**) とし、最後に 1-bromo-3-methyl-2-butene (**58**) と反応させることでプレニル基を導入し Ppc-1 (**18**) を 5 段階、総収率 14% で得た (Scheme 3)。



Scheme 3. Synthesis of Ppc-1 (**18**).

第2節 Pt-1 の合成

Pt-1 (**19**) は尿酸 (**44**) の N-3, N-7 にメチル基が, N-9 にゲラニル基が結合した化合物である。市販されている 3,7-dimethyluric acid (**59**) に geranyl bromide (**60**) を作用させることで Pt-1 (**19**) の合成を行った (Scheme 4)。収率は 3.0% と非常に悪く, TLC 上でも多数のスポットが確認された。Pt-1 (**19**) 以外のものは *O*-geranyl 化体や多置換体が生成していた。

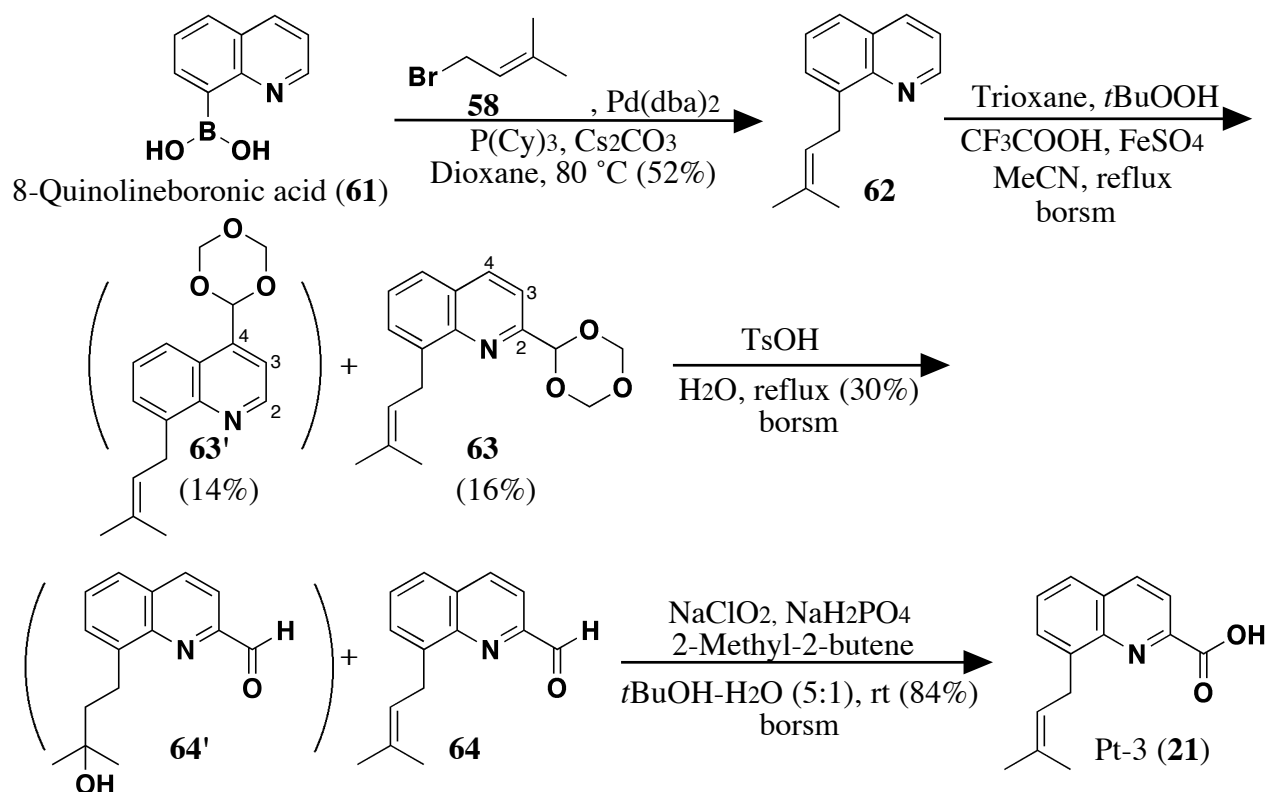


Scheme 4. Synthesis of Pt-1 (**19**).

第3節 Pt-3 の合成

Pt-3 (**21**) はキノリンの2位にカルボキシル基、8位にプレニル基が結合した化合物である。キノリンの2位にカルボン酸を導入する方法として、まずアルデヒド等価体であるトリオキサニル基を置換させ、³⁵ 加水分解の後に酸化する方法を採用することとした。また、8位については鈴木-宮浦クロスカップリングを用いることとした。

まず原料の 8-quinolineboronic acid (**61**) と 1-bromo-3-methyl-2-butene (**58**) とをカップリングさせることでプレニル基を導入し³⁶ **62** を得た。つづいて過剰量の trioxane 存在下、*t*BuOOH を用いてトリオキサニルラジカルを発生させ、キノリン環の2位にトリオキサニル基を導入し³⁵ **63** とした。収率は 16% と悪かったが、これは2位ではなく4位にトリオキサニル基が入った異性体 **63'** が生成したためである。つづいて TsOH を用いて加水分解をすることでアルデヒド体 **64** を得た。ここでも収率は 30% と悪く、副生成物はオレフィンへの水和反応が起きた **64'** であった。最後に亜塩素酸ナトリウムを用いて酸化することで Pt-3 (**21**) を4段階、総収率 2.1% で得た (Scheme 5)。

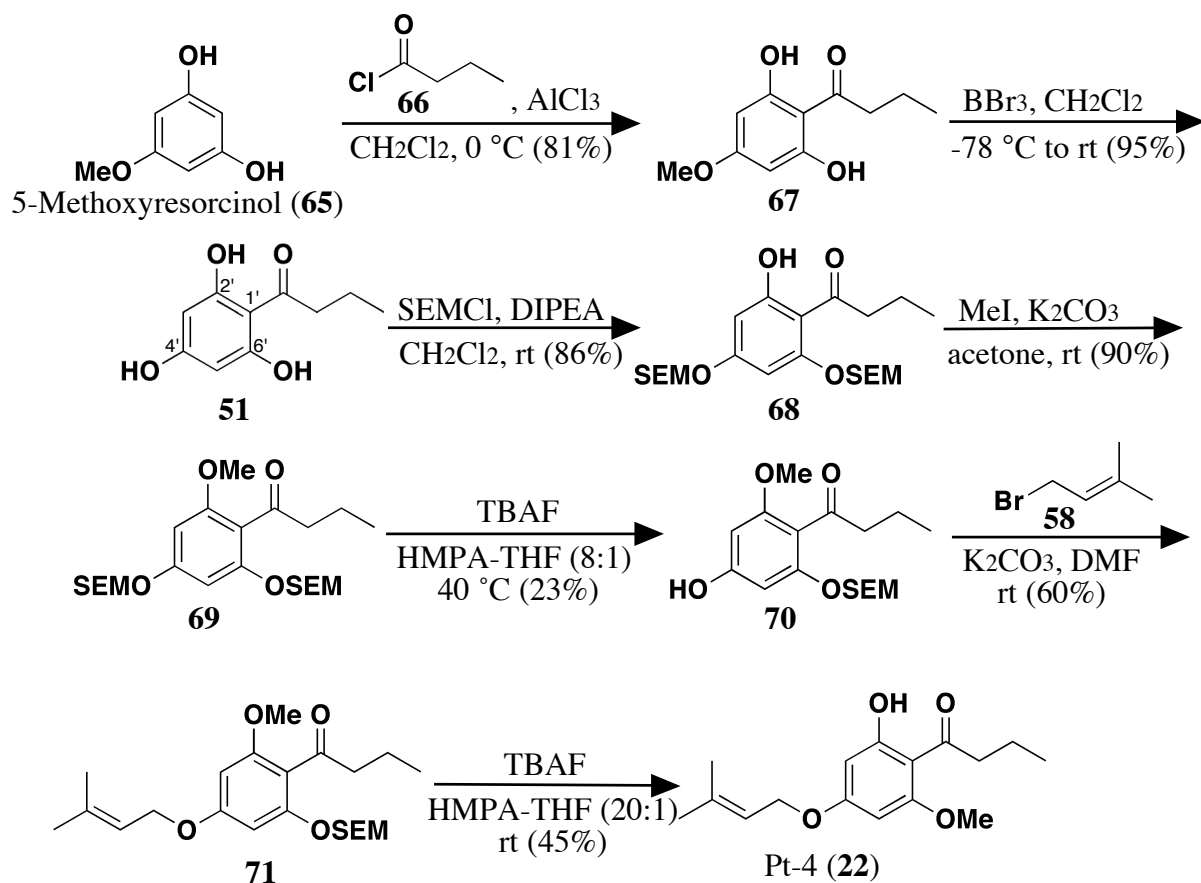


Scheme 5. Synthesis of Pt-3 (**21**).

第 4 節 Pt-4 の合成

Pt-4 (**22**) と Pt-5 (**23**) は DIF-1 (**3**) の類縁体であるため、DIF-1 (**3**) の合成法¹³ を利用することとした。フェノール性水酸基に結合する置換基や置換部位は DIF-1 (**3**) とは異なるが、分子内水素結合した水酸基は反応が起こりにくいことから、ベンゼン環の 1' 位にカルボニル基、2', 4', 6' 位に水酸基を持つ **51** (Scheme 6) の様な化合物においてはベンゼン環の 4', 6' 位にのみ置換基を導入することができると思われる。また第 3 節で示されたように、プレニル基は酸性条件で水和を起こしやすいと思われたため、保護基には TBAF で外すことが可能な SEM 基を用いることにした。

まず、原料に 5-methoxyresorcinol (**65**) と butyryl chloride (**66**) とを用い Friedel-Crafts アシル化反応を行うことでアシル基を導入した化合物 **67** とし、つづいて BBr₃ で脱メチル化させ **51** を得た。さらに SEMCl を用いて分子内水素結合したフェノール性水酸基以外を保護し **68** とし、MeI を作用させることでアシル基のオルト位の水酸基にメチル基を導入した **69** を得た。次に、TBAF を用いて SEM 基を脱保護したところアシル基のパラ位のみ選択的に脱保護された **70** が 23% という収率で得られた。そこで **70** に 1-bromo-3-methyl-2-butene (**57**) を作用させることでアシル基のパラ位にプレニル基を導入した **71** へと変換し、最後に再度 TBAF を用いて残った SEM 基を脱保護することで、Pt-4 (**22**) を 7 段階、総収率 3.7% で得た (Scheme 6)。

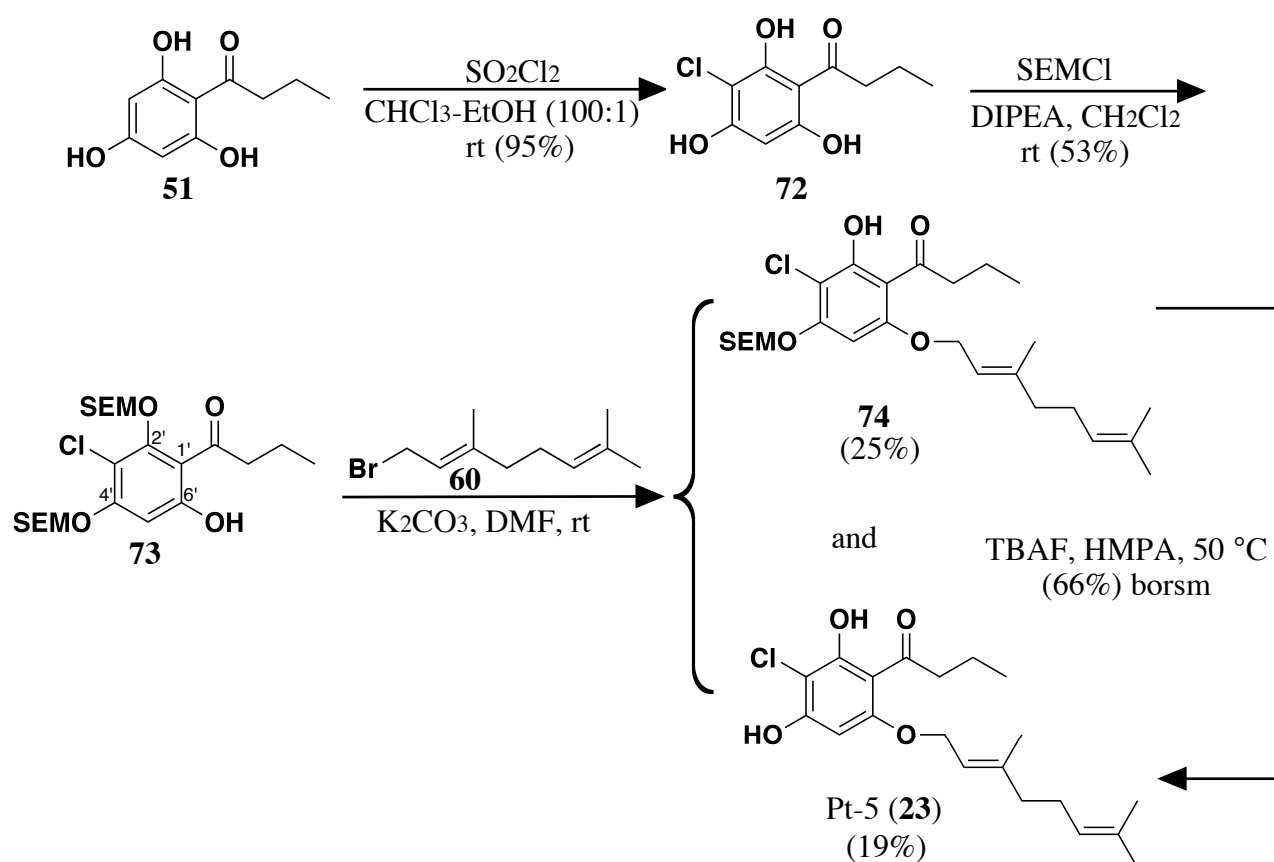


Scheme 6. Synthesis of Pt-4 (**22**).

第5節 Pt-5 の合成

Pt-5 (**23**) は Pt-4 (**22**) と同じ中間体 **51** から合成を行った。また、塩素化の条件では、ゲラニル基のオレフィンに塩素原子が付加してしまうと思われたため先に塩素化を行うこととした。

51 に sulfuryl chloride を用いて **72** とし、つづいて SEMCl を用いて 2', 4' 位のフェノール性水酸基を選択的に保護した **73** を得た。次に geranyl bromide (**59**) を用いてゲラニル基を導入したところ、SEM 基が1個脱保護された **74** と最終目的物である Pt-5 (**23**) がそれぞれ 25% と 19% の割合で得られた。Pt-4 (**22**) を同様の条件 (DMF, K₂CO₃) でプレニル化した際には SEM 基はほとんど脱保護されなかったことから、塩素原子がベンゼン環に置換し、環の電子密度が変わったことで反応性が変わったものと思われる。また、**74** を TBAF を用いて脱保護することでも Pt-5 (**23**) が得られた。よって Pt-5 (**23**) を Pt-4 (**22**) と共通の原料である 5-methoxyresorcinol (**64**) から 6 段階、総収率 14% で合成したことになる (Scheme 7)。



Scheme 7. Synthesis of Pt-5 (**23**).

第 6 節 Ppc-1 および Pt-1~5 の生物活性

前節までに合成した Ppc-1 (18), Pt-1 (19) および Pt-3~5 (21~23) と第 1 章で単離した Pt-2 (20) について, 哺乳類細胞に対する増殖抑制作用と 3T3-L1 マウス繊維芽細胞における糖代謝促進作用について検討を行った.

(i) 哺乳類細胞に対する増殖抑制作用

Ppc-1 (18) および Pt-1~5 (19~23) について, K562 ヒト白血病細胞および HeLa ヒト子宮癌細胞を用いて細胞増殖抑制作用の検討を行った. また正常細胞における毒性を評価するために 3T3-L1 細胞において細胞増殖抑制作用の検討を行った.

細胞増殖抑制作用の検討は各種細胞を 15 μ M の各化合物存在下で 3 日間培養し, 細胞数をコントロールと比較することで行った (Figure 31).

また Pt-5 (23) については DIF-3 (25) と比較するために K562 細胞を濃度を変えた Pt-5 (23) (0~20 μ M) 存在下で培養し, 50% 細胞増殖阻害濃度 (IC₅₀) を算出した.

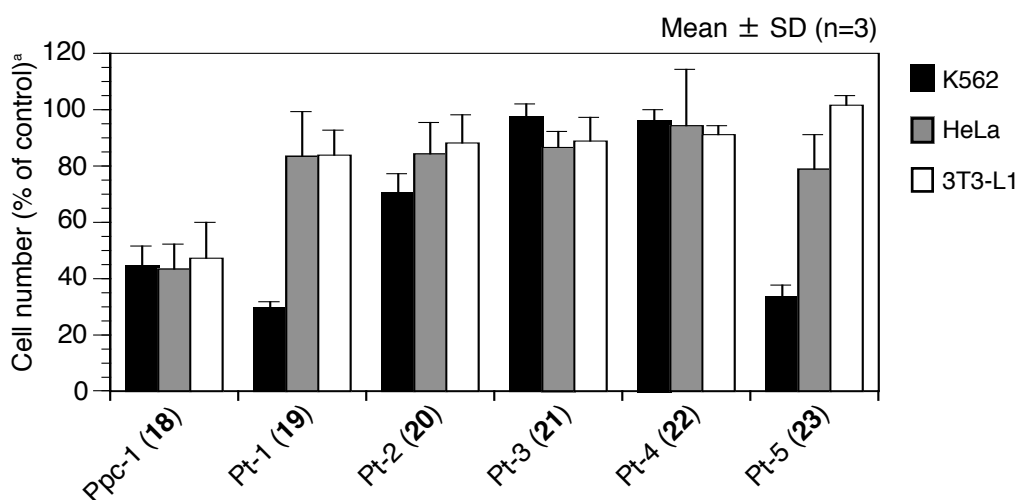
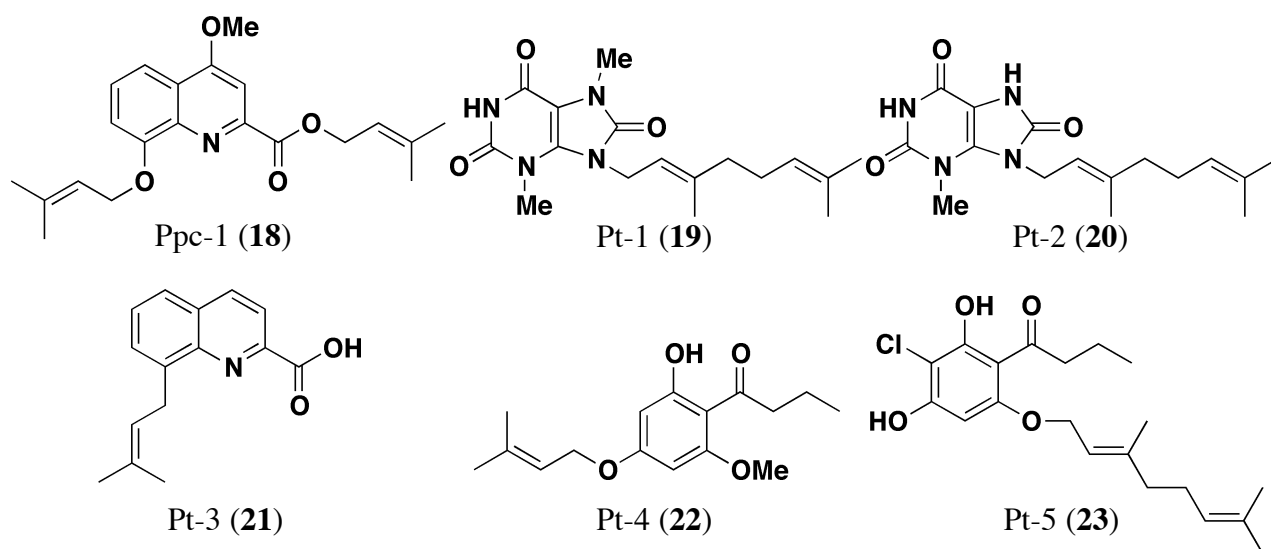


Figure 31. Effects of Ppc-1 (18) and Pt-1~5 (19~23) on cell growth in K562 cells, HeLa cells and 3T3-L1 cells.

^aRelative cell number after incubated *in vitro* with a vehicle (0.15% DMSO) or 15 μ M of compounds for 3 days.

活性試験の結果 Ppc-1 (18) はいずれの細胞に対しても細胞増殖率を 50% 以下に抑制することが明らかとなった。また Pt-1 (19) は K562 細胞に対しては細胞増殖率を 30% 以下に抑制したが、HeLa 細胞や 3T3-L1 細胞では細胞増殖率が 80% 以上であり活性を示さなかった。一方、構造がほとんど同じである Pt-2 (20) はいずれの細胞に対しても細胞増殖率が 70% 以上であり細胞増殖抑制作用を示さなかった。また Pt-3 (21) はいずれの細胞に対しても細胞増殖率は 80% 以上であり全く細胞増殖抑制作用を示さなかった。

DIF-1 (3) の類縁体のうち塩素原子をもたない Pt-4 (22) はいずれの細胞に対しても細胞増殖率は 90% 以上であり細胞増殖抑制作用を全く示さなかったが、塩素原子を 1 個有する Pt-5 (23) は K562 細胞に対してのみ細胞増殖率を 40% 以下に抑制した。一方、同様に

塩素原子を 1 個有する DIF-3 (**25**) の構造活性相関研究において、Pt-5 (**23**) のようにアシル基がヘキサノイル基からブチリル基へ変換した誘導体 **75** では K562 細胞における細胞増殖抑制作用が低下することが明らかになっている。¹³ さらに DIF-3 (**25**) の 4 位のメトキシ基と 6 位の水酸基が入れ替わった誘導体 **76** も合成されているが、その活性は DIF-3 (**25**) と比べると非常に低いものであった。³⁷ しかしながらアシル基がブチリル基であり、6 位にゲラニルオキシ基が結合した Pt-5 (**23**) の活性は DIF-3 (**25**) と同等であった。よって DIF-3 (**25**) のアシル基のオルト位に存在する水酸基のうち一方をアルキル化することで活性が増強される可能性があると思われる (Figure 32).

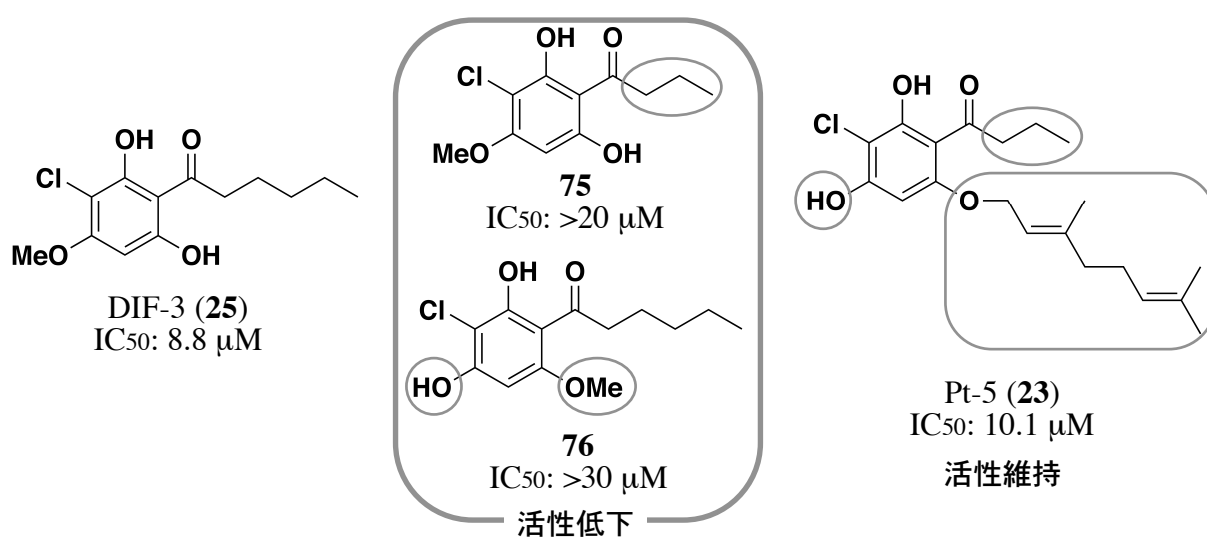


Figure 32. IC_{50} of DIF-3 (**25**) and derivatives to K562 cells.

(ii) 3T3-L1 細胞に対する糖代謝促進作用

細胞性粘菌柄細胞分化誘導因子である DIF-1 (3) が 3T3-L1 細胞に対して糖代謝を促進するという作用が報告されているため,²⁵ Ppc-1 (18) および Pt-1-5 (19~23) についてもその作用を検討した. 3T3-L1 細胞を各化合物 (20 μ M) 存在下で数時間培養し, 培地に残っている glucose の濃度を測定した. そして消費した glucose 量を計算し, コントロールと比較した (Figure 33).

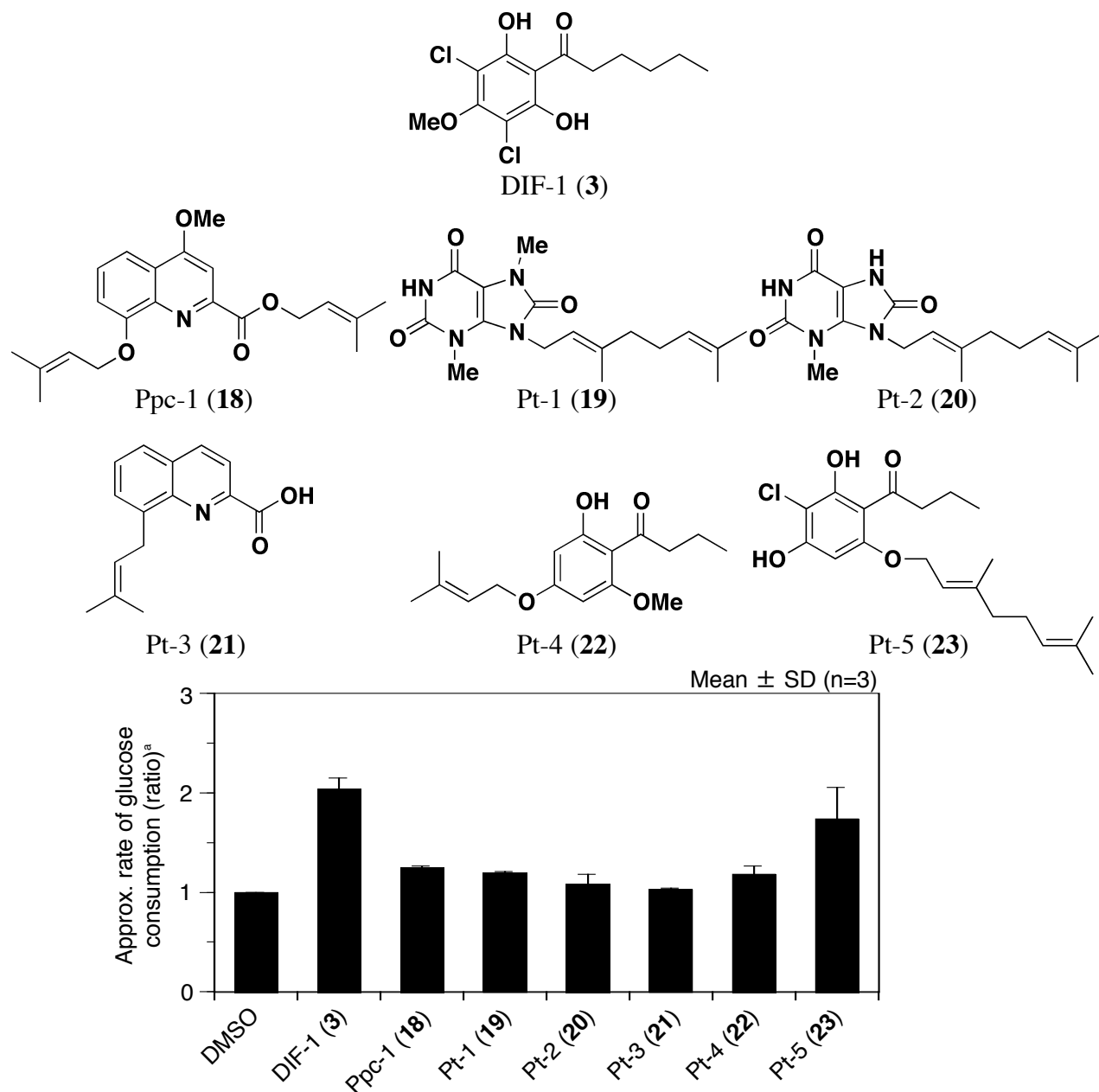


Figure 33. Effects of DIF-1 (3), Ppc-1 (18) and Pt-1~5 (19~23) on glucose consumption in 3T3-L1 cells.

^aThe glucose concentration of each medium was measured after incubated *in vitro* with a vehicle (0.2% DMSO) or 20 μ M of compounds for several hours and approximate rate of glucose consumption was calculated.

活性試験の結果, Pt-5 (**23**) にのみ糖代謝促進作用が見られた. このことは塩素原子を 1 個有する DIF-3 (**25**) の誘導体の多くが DIF-1 (**3**) と同等の活性を有することとも合致する.²⁶ また Pt-5 (**23**) の活性は DIF-1 (**3**) と比べると若干弱い, これまでアシル基のオルト位の水酸基を 1 つだけアルキル化した DIF 誘導体は先ほど述べた **76** 以外に合成されていないため, 今後検討の余地があると思われる.

本研究での生物活性試験では粘菌細胞を用いた活性試験を行っていない. 本研究で合成した化合物はいずれも細胞性粘菌の子実体の抽出物より得られた化合物であるため, 粘菌細胞への作用について今後活性試験を行っていく必要があると考えられる.

第3章 DIF-1 誘導体の合成と生物活性

緒論で述べたように、細胞性粘菌の産生する柄細胞分化誘導因子 DIF-1 (**3**) は、粘菌細胞だけではなく、ある種の哺乳類腫瘍細胞の分化に対しても作用することが知られている。また、近年の研究では哺乳類正常細胞に対して糖の取り込みを促進するという知見が得られている。そこで本研究では、細胞分化機構解明のための分子プローブ・新規抗腫瘍薬および新規糖尿病治療薬の開発を目的として、いまだ十分に検討がなされていない DIF-1 (**3**) のカルボニル基に着目した誘導体を合成することとした。そして誘導体の粘菌柄細胞分化誘導作用・腫瘍細胞増殖抑制作用および正常細胞に対する糖取り込み促進作用について検討することにした。

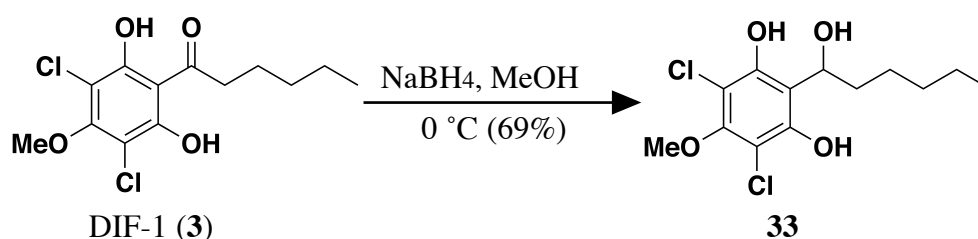
第1節 DIF-1 誘導体の合成

DIF-1 (**3**) のカルボニル基が活性にどのような影響をもたらしているか検討するためにカルボニル基を変換した誘導体を合成することにした。

(i) カルボニル還元体の合成

カルボニル基が消失すると活性にどのような変化を及ぼすか検討するために、カルボニル基を水酸基に変換した誘導体を合成した。また原料となる DIF-1 (**3**) はすでに当研究室で合成されているものを用いた。¹³

DIF-1 (**3**) を原料とし、NaBH₄ を用いて還元することにより、カルボニル基を水酸基へと変換した誘導体 **33** を合成した (Scheme 8)。なおこの化合物は不安定であり、4℃で保存していても時間が経つにつれ徐々に分解していくことが明らかとなった。



Scheme 8. Synthesis of DIF-1 (**3**) derivatives.

(ii) DIF-1 エステル・アミド体の合成

カルボニル基をエステル基またはアミド基に変換することで活性にどのような影響を及ぼすかを検討することにした。一般に生物活性物質におけるアルキル鎖の役割は、化合物が受容体や酵素に立体的に合致するように大きさを決める要因となっているか、化合物の生体内における分布を左右する脂溶性を決める要因となっていることが多い。実際これまでに行われた細胞性粘菌の柄細胞分化誘導作用に対する DIF-1 (**3**) の構造活性相関研究では、アシル基が炭素鎖 6 の DIF-1 (**3**) が最も活性が強く、その前後の長さの誘導体では活性の減弱がみられた。^{13, 24} そこで本研究では DIF-1 (**3**) を基準として、カルボニル基から末端炭素までの原子数を 6 にすることで分子の大きさを合わせた誘導体と、脂溶性パラメータである分配係数 (ClogP) を合わせた誘導体を合成することにした。エステル体については ClogP の値が DIF-1 (**3**) に最も近い化合物が、分子の大きさを合わせたブチルエステル体 **34** であったため、次に近い化合物である **35** もあわせて合成することにした。また、アミド体については分子の大きさを合わせたブチルアミド体 **36** および ClogP の値を合わせたヘキシルアミド体 **38** に加えて、カルボニル基から末端炭素までの原子数を 7, 9, 10 に変換した誘導体 **37, 39, 40** も合成することで活性への影響を検討した (Figure 34)。なお、化合物の ClogP の算出には ChemDraw Ultra version 10.0 (Cambridge Soft) を用いた。

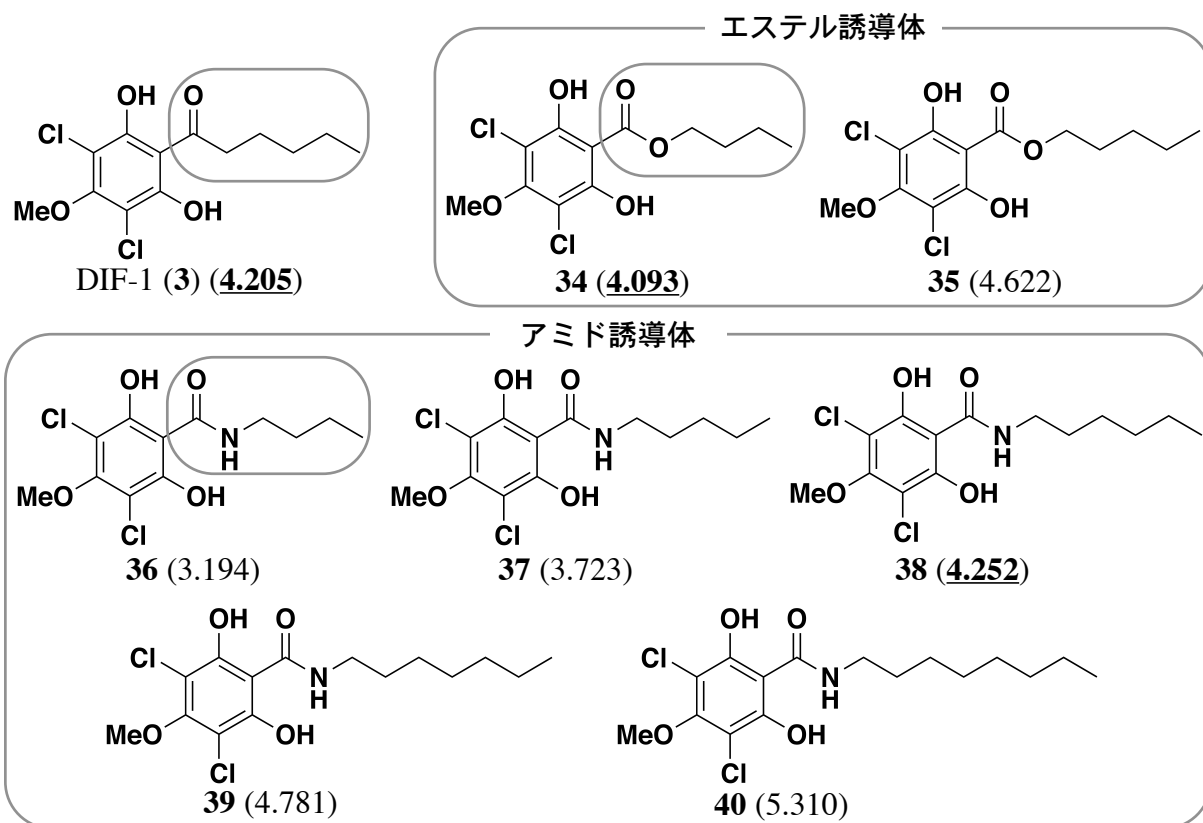
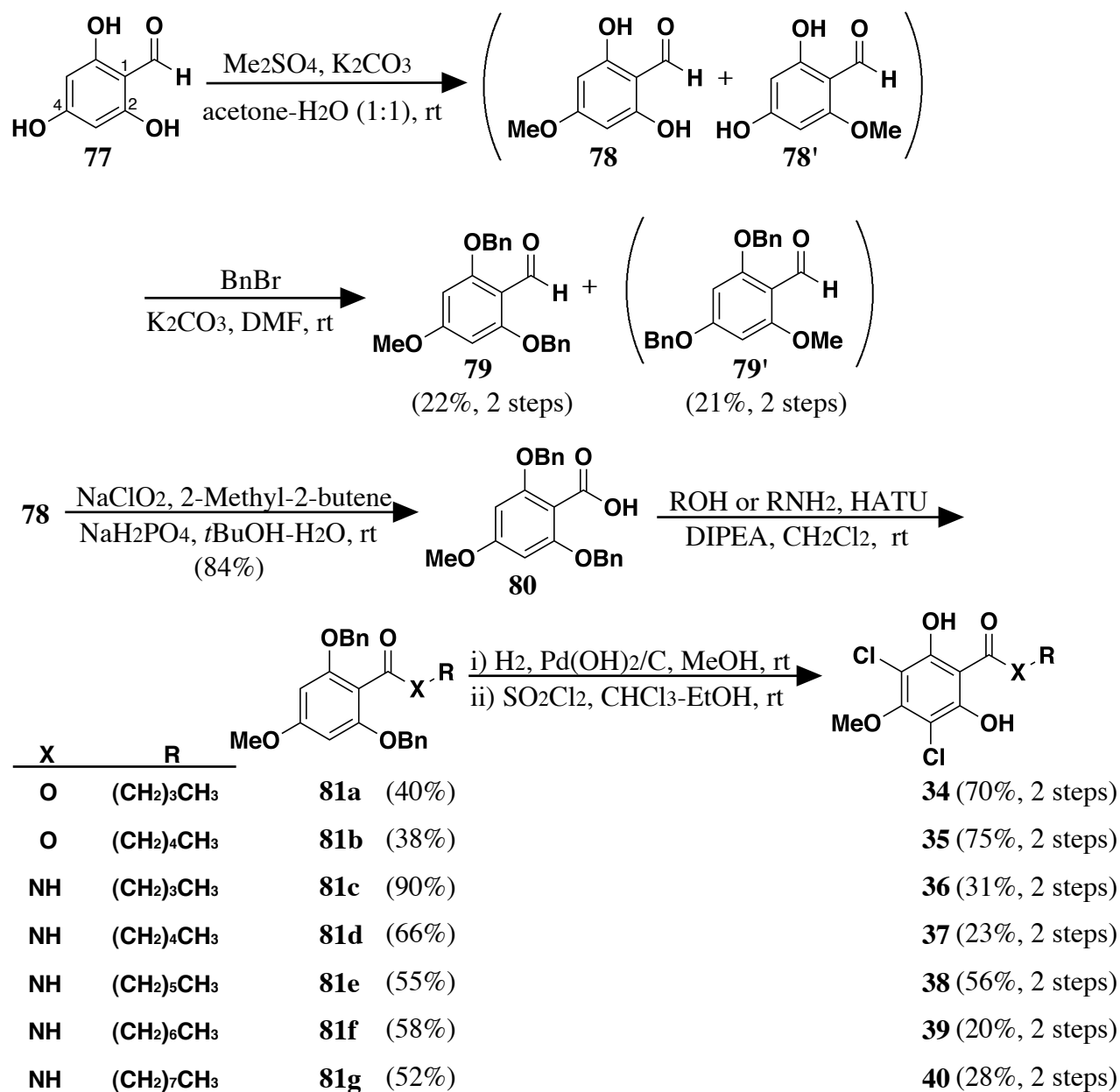


Figure 34. Structures of DIF-1 (**3**) and its derivatives.
The hydrophobic index (ClogP) was place in parentheses.

まず原料として 2,4,6-trihydroxybenzaldehyde (**77**) を用い、dimethyl sulfate でメチル化することにより、4 位の水酸基がメトキシ基に変換された **78** と 2 位の水酸基がメトキシ基に変換された **78'** の混合物を得た。この二つの化合物は分離できなかったため、そのまま次の反応へと進めた。**78**, **78'** の混合物に対して benzyl bromide を用いて、芳香環上の残ったフェノール性水酸基を保護することで **79**, **79'** とし、カラムクロマトグラフィーを用いてそれぞれを分離した。つづいて **79** に対して亜塩素酸ナトリウムによる酸化を行うことで、アミド体、エステル体の共通中間体となる **80** を合成した。次に EDCI を用いてエステル化またはアミド化を行ったところ反応が全く進行しなかった。これは隣接するベンジル基の立体的なかさ高さのためだと推測される。そこで縮合剤として強力な活性を有する HATU を用いたところ円滑に反応は進行し、butanol, pentanol, butylamine, pentylamine, hexylamine, heptylamine, octylamine との縮合により **81a~g** を得た。ただし、アルコールとの反応においてはカルボン酸と HATU が結合した中間体と思われる化合物が単離され、収率も低かった。つづいて **81a~g** にそれぞれ Pd(OH)₂ を触媒とした接触水素化を行いベン

ジル基の脱保護をし、最後に sulfuryl chloride を用いて塩素化することで **34~40** を得た (Scheme 9). アミド体における塩素化では反応後の TLC でも多数のスポットが確認されており、収率が低くなってしまった.



Scheme 9. Synthesis of DIF-1 (**3**) derivatives.

第2節 DIF-1 誘導体の生物活性

前節で合成した DIF-1 誘導体 8 種について、細胞性粘菌に対する柄細胞分化誘導作用、K562 ヒト白血病細胞および 3T3-L1 マウス繊維芽細胞に対する増殖抑制作用、また 3T3-L1 細胞に対する糖取り込み促進作用を検討した。

(i) 細胞性粘菌柄細胞分化誘導作用

Dictyostelium discoideum 野生株の粘菌アメーバは、cAMP 存在下で培養すると自らが産生する DIFs の作用によって 90% 以上の細胞が柄細胞に分化する。また、DIF 産生に欠陥のある突然変異株 *D. discoideum* HM44 は、同じ条件下では柄細胞に分化できないが、外部から DIF-1 (**3**) を与えれば、その濃度に応じた数の細胞が柄細胞に分化できる。²⁰ この培養系を用いて今回合成した誘導体の柄細胞分化誘導作用を検討した。

柄細胞分化誘導作用の検討は HM44 細胞を各種誘導体 (0.5 nM) 存在下で 2 日間培養した後に、位相差顕微鏡により柄細胞への分化比率を測定することで行った (Figure 35)。

合成した各種誘導体のうち、還元体 **33** やエステル誘導体 **34, 35** では活性が完全に消失した。また、アミド誘導体 **36~40** ではカルボニル基から末端炭素までの原子数が 6~8 の化合物 **36~38** において強力な活性が見られ、特に **37, 38** では DIF-1 (**3**) よりも強い活性を示した。しかし原子数 9 以上の化合物 **39, 40** になると急激に活性が低下した。

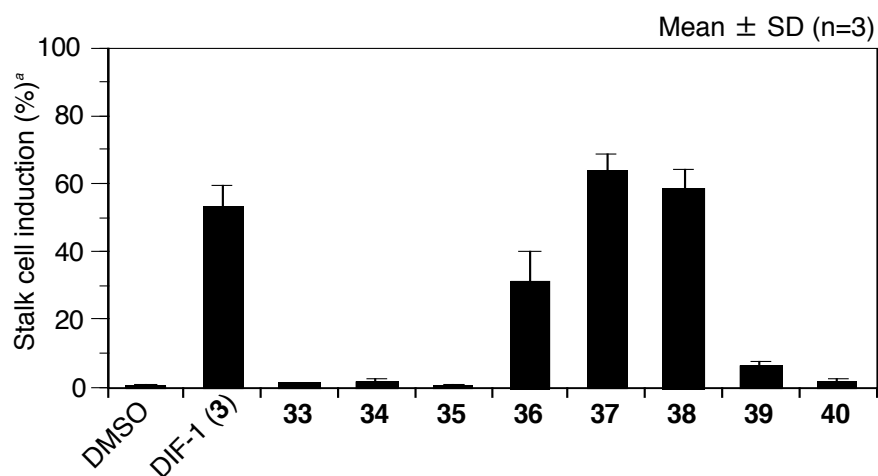
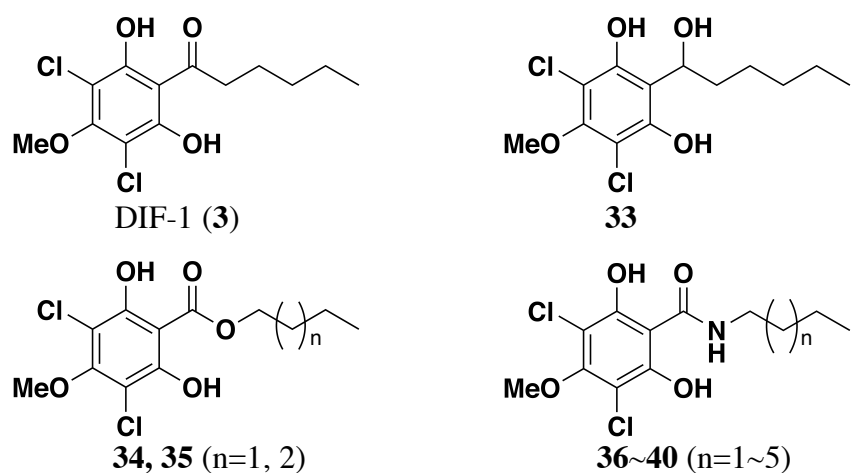


Figure 35. Effects of DIF derivatives on stalk-cell formation in HM44 cells.
^aStalk-cell population (percentage of total cells) after incubated *in vitro* with a vehicle (0.2% DMSO) or 0.5 nM of DIF derivatives for 2 days.

(ii) 哺乳類細胞に対する増殖抑制作用

DIF-1 誘導体の腫瘍細胞に対する増殖抑制作用について検討するために K562 ヒト白血病細胞, また正常細胞に対する毒性を検討するために 3T3-L1 マウス繊維芽細胞を各種誘導体 (15 μ M) 存在下で 3 日間培養して細胞数をコントロールと比較した (Figure 36).

K562 細胞に対する増殖抑制作用は DIF-1 (3) と比較すると, 還元体 33 やエステル誘導体 34, 35 では活性が完全に消失してしまったが, アミド誘導体 36~40 のうちカルボニル基から末端炭素までの原子数が 6~8 の誘導体 36~38 では DIF-1 (3) と同程度の活性が見られた. また原子数 9 の誘導体 39 は DIF-3 (25) に匹敵する活性を有していた. しかし, 原子数 10 になると急激に活性が低下し, 最適な原子数は 9 であることが明らかとなった.

また 39 は正常細胞である 3T3-L1 細胞に対しても毒性を示しており, DIF-3 (25) のような腫瘍細胞に選択的な活性は示さなかった.

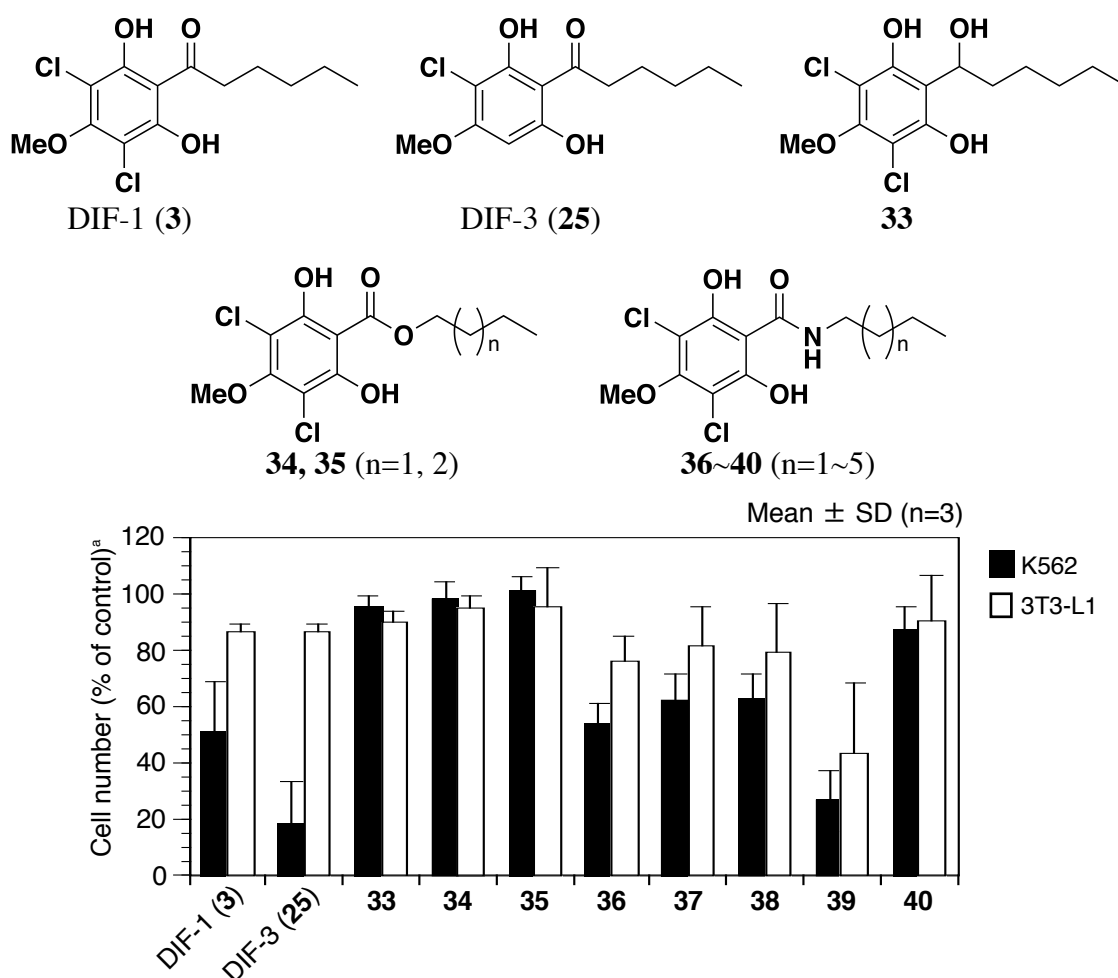


Figure 36. Effects of DIF derivatives on cell growth in K562 cells and 3T3-L1 cells. "Relative cell number after incubated *in vitro* with a vehicle (0.15% DMSO) or 15 μ M of compounds for 3 days.

(iii) 3T3-L1 マウス繊維芽細胞に対する糖取り込み促進作用

DIF-1 誘導体の正常細胞に対する糖取り込み促進作用について検討するために、3T3-L1 マウス繊維芽細胞を各種誘導体 (20 μ M) 存在下で数時間培養し、培地に残っている glucose の濃度を測定した。そして消費した glucose 量を計算し、コントロールと比較した (Figure 37).

還元体 **33** やエステル誘導体 **34**, **35** には全く活性が見られなかった。アミド誘導体 **36~40** については **39** をピークとして糖取り込み促進作用活性が見られたがいずれの化合物も DIF-1 (**3**) よりも活性は減弱していた。

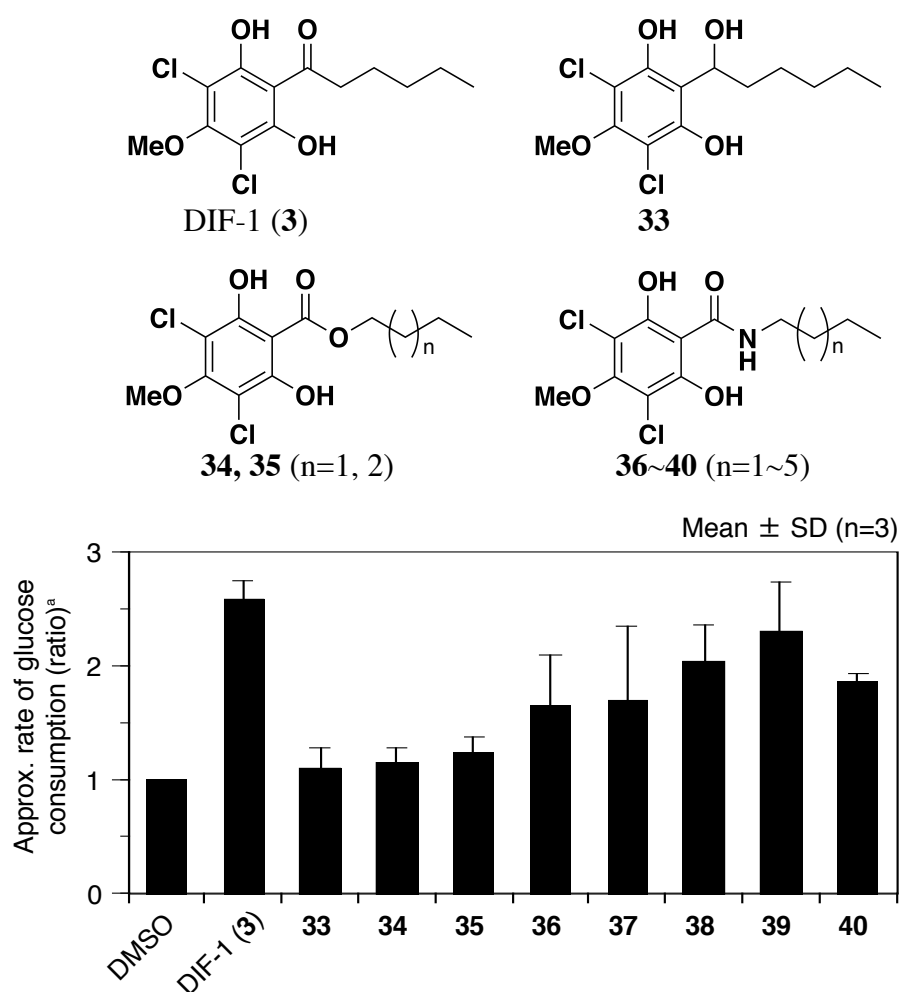


Figure 37. Effects of DIF derivatives on glucose consumption in 3T3-L1 cells.
^aThe glucose concentration of each medium was measured after incubated *in vitro* with a vehicle (0.2% DMSO) or 20 μ M of DIF derivatives for several hours and approximate rate of glucose consumption was calculated.

第3節 考察

本研究以前に行われた構造活性相関研究では、DIF-1 (**3**) の塩素原子、メトキシ基、フェノール性水酸基およびアシル基の長さ・かさ高さを変換した誘導体が多数合成されたが、細胞性粘菌の柄細胞分化誘導作用について DIF-1 (**3**) の活性を上回るような化合物は得られなかった。^{13, 24} 一方、本研究ではカルボニル基に着目し、脂溶性パラメーター ClogP を指標として化合物をデザインし誘導体の合成を行った。その結果 ClogP が DIF-1 (**3**) と近いアミド誘導体 **37**, **38** は柄細胞分化誘導作用において DIF-1 (**3**) を上回る活性を示した。化合物 **37**, **38** は DIF-1 (**3**) とはカルボニル基から末端炭素までの原子数が異なり分子の大きさは異なる。このことから、細胞性粘菌柄細胞分化誘導作用における DIF-1 (**3**) のアシル鎖の役割は分子の脂溶性を調節するものであることが明らかとなった。

また、本研究で合成した DIF 誘導体は、細胞増殖抑制作用と糖消費促進作用については既存の誘導体よりも強い活性を示さなかった。よってこれらの作用にはカルボニル基の変換は有用ではないことが明らかとなった。

また、いずれの作用についても還元体 **33** およびエステル体 **34**, **35** は全く活性を示さなかった。還元体 **33** が活性を示さなかったことから、活性の発現にはカルボニル基が重要であることが示唆された。またエステル体 **34** はカルボニル基を有する上に ClogP の値は細胞性粘菌柄細胞分化に強力な活性を示した **36**, **37** よりも DIF-1 (**3**) に近かった。そのため活性を示さなかった原因は他にあると考えられる。例えば細胞内に取り込まれたエステル体がエステラーゼにより分解されてしまった可能性が挙げられる。

結語

土壤中に広く存在する細胞性粘菌は、生物学の分野において発生・分化・細胞運動のモデル生物として用いられてきたが、大量培養の難しさなどから天然物化学的研究はほとんど行われていなかった。また、細胞性粘菌はこれまでに研究が行われている微生物とも分類学的に大きく異なるため代謝産物も大きく異なることが考えられた。

そこで、本研究では細胞性粘菌を新規二次代謝産物探索における新たな天然資源としてとらえ、細胞性粘菌 *Polysphondylium tenuissimum* を大量培養し、それらの子実体に含まれる成分について研究を行った。その結果、*P. tenuissimum* のメタノール抽出物より新規化合物である Pt-1~5 (19~23) を得た。構造解析を行った結果、Pt-1~5 (19~23) は既知の母核構造にゲラニル基やプレニル基が結合した化合物であった。

単離された量が少なかった Pt-1 (19)、および Pt-3~5 (21~23) に加え、以前に細胞性粘菌 *P. pseudo-candidum* より単離されたプレニル基を有する芳香族化合物である Ppc-1 (18) について合成を行った。さらに、Ppc-1 (18) および Pt-1~5 (19~23) の細胞増殖抑制作用について検討した。その結果、DIF-3 (25) の類縁体である Pt-5 (23) は K562 ヒト白血病細胞に対して DIF-3 (25) と同程度の活性を示し、これまでに行われていない誘導体化が DIF-3 (25) の活性を増強する可能性を示した。プレニル基が結合した芳香族化合物として細胞性粘菌より discadenine (1) が孢子発芽抑制物質として報告されていることから、今後は Ppc-1 (18) および Pt-1~5 (19~23) の細胞性粘菌に対する作用を検討する必要があると考えられる。

また、細胞性粘菌柄細胞分化誘導因子である DIF-1 (3) のカルボニル基に着目した誘導体を合成し生物活性について検討した。その結果アミド誘導体である 37, 38 は柄細胞分化誘導作用において DIF-1 (3) よりも高い活性を示した。以前に行われた構造活性相関研究では塩素原子、メトキシ基、フェノール性水酸基およびアシル基の長さ・かさ高さを変換した誘導体が多数合成されたが、DIF-1 (3) の活性を上回るような化合物は得られておらず、カルボニル基に着目した誘導体化は有用であると思われる。また最も強力な活性を示した化合物 38 は DIF-1 (3) よりもカルボニル基から末端炭素までの原子数が 2 個多く分子

の大きさは異なるが、脂溶性パラメーター ClogP は DIF-1 (3) とほぼ一致していた。このことから、DIF-1 (3) のアシル鎖は柄細胞分化誘導作用を示すための脂溶性を調節していることが示唆された。よって脂溶性を維持しながらアシル基を変換することで、さらに活性の強い化合物や DIF-1 (3) の細胞性粘菌における作用解明のための分子プローブを開発することができると思われる。

細胞性粘菌は大量培養が困難であるという理由からこれまでに成分探索があまり行われていなかった微生物である。しかし、これまでに示したように細胞性粘菌からは多くの新規化合物が得られてきており、またその中には DIF-1 (3) のように強力な生物活性を有する化合物も存在し、今後も有用な化合物が得られてくるものと思われる。細胞性粘菌が新規生物活性物質を提供することにより、天然物化学および創薬化学の分野に貢献していくことを期待する。

実験の部

マススペクトルは日本電子 JEOL JMS-DX 303 型質量分析計, JMS-700 型質量分析計および JMS-T 100 GC 型質量分析計を使用した。NMR スペクトルの測定は日本電子 JEOL ECA-600 型核磁気共鳴装置および JEOL AL-400 型核磁気共鳴装置を使用し, 内部標準物質として TMS を用いた。化学シフト値は ppm で表し, 多重度は, 一重線 : s, 二重線 : d, 三重線 : t, 四重線 : q, 五重線 : quint, 六重線 : sext, 二分裂した二重線 : dd, 二分裂した三重線 : dt, 多重線 : m, 幅広いシグナル : br. で表した。カラムクロマトグラフィーは Silica gel 60 (70-230 mesh ASTM, Merck), Cosmosil 140C₁₈-OPN (nacalai) を用いた。HPLC は LC-908W (Japan Analytical Industry Co., Ltd.), LC-9201 (Japan Analytical Industry Co., Ltd.) を用い, それらのカラムとして, 前者は JAIGEL-GS310 (φ 21.5 mm x 500 mm) (Japan Analytical Industry Co., Ltd.), 後者は JAIGEL-W252 (φ 20.0 mm x 250 mm) (Japan Analytical Industry Co., Ltd.) を用いた。TLC は TLC aluminium sheets Silica gel 60F₂₅₄ (0.25 mm, Merck), TLC aluminium sheets RP-18 F₂₅₄S (0.25 mm, Merck) を用い, 検出は 254 nm における UV 照射下における蛍光, アニスアルデヒド硫酸溶液噴霧による加熱発色により行った。各種の試薬については, 市販のものを精製せずにそのまま用いた。また, 特に断りのない限り, 反応は大気中で行った。

第 1 章の実験

細胞性粘菌の子実体の培養

滅菌した 50 mL 遠沈管に分取した A 液体培地 [D-(+)-glucose 0.5%, polypepton 0.5%, yeast extract 0.05%, KH_2PO_4 0.225%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.137%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%] 約 20 mL に寒天培地上の *Klebsiella aerogenes* を白金耳でとり、懸濁させた。これを 37 °C で 12 時間振盪培養したものを菌液とした。A 寒天培地 (agar 1.5%, 直径 15 cm ペトリシャーレ, 約 60 mL) に *Klebsiella aerogenes* の菌液をマイクロピペットで 550 μL とり、コンラージ棒で均一に塗布した。そこに滅菌した爪楊枝で細胞性粘菌 *Polysphondylium tenuissimum* の子実体を接種し、コンラージ棒で同様に塗布した。光照射下 22 °C で 6 日間培養した後、形成した子実体を回収した。培地はオートクレーブ (121 °C, 20 分) で滅菌したものをを用いた。

Polysphondylium tenuissimum の子実体の抽出

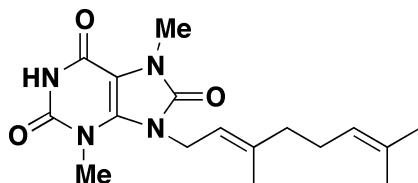
人工培養した *Polysphondylium tenuissimum* の子実体 (乾燥重量 : 73.60 g) を室温下でメタノール (2 L) を用いて、3 回繰り返して抽出した。得られた抽出液を濾過、減圧濃縮し、メタノール抽出物 (18.15 g) を得た。これに、500 mL の水を加えて懸濁させた後、酢酸エチル (400 mL \times 4) で抽出し、減圧濃縮して、酢酸エチル可溶画分 (5.49 g) を得た。

酢酸エチル可溶画分の分画

酢酸エチル可溶画分 (5.49 g) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane, hexane-EtOAc, EtOAc, EtOAc-MeOH, MeOH で順次溶出させ、Fraction 1 (392.1 mg, hexane), Fraction 2 [1.3 mg, hexane-EtOAc (19:1)], Fraction 3 [717.5 mg, hexane-EtOAc (19:1)], Fraction 4 [764.0 mg, hexane-EtOAc (9:1)], Fraction 5 [450.0 mg, hexane-EtOAc (9:1-4:1)], Fraction 6 [1176.8 mg, hexane-EtOAc (4:1)], Fraction 7 [84.3 mg, hexane-EtOAc (4:1)], Fraction 8 [47.0 mg, hexane-EtOAc (2:1)], Fraction 9 [27.1 mg, hexane-EtOAc (2:1)], Fraction 10 [48.6 mg, hexane-EtOAc (2:1-1:1)], Fraction 11 [4.3 mg, hexane-EtOAc (1:2)], Fraction 12 [12.3 mg, hexane-EtOAc (1:2)], Fraction 13 (36.0 mg, EtOAc), Fraction 14 [509.6 mg, EtOAc-MeOH (1:1)], Fraction 15 (163.1 mg, MeOH),

Fraction 16 (44.7 mg, MeOH) を得た.

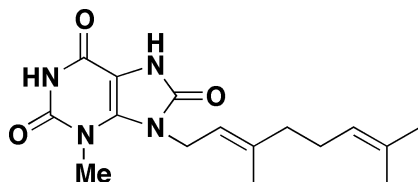
Pt-1 (19) の単離



Fraction 14-5 (25.1 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane, hexane-EtOAc (9:1-1:1), EtOAc, EtOAc-MeOH (3:1), MeOH で順次溶出させ, Fraction 14-5-1~8 を得た. Fraction 14-5-7 (8.5 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーに付し, H₂O-MeOH (9:1-1:9), MeOH, MeOH-EtOAc (4:1), EtOAc で順次溶出させ, H₂O-MeOH (1:1) の溶出画分より Pt-1 (19) (1.8 mg) を得た.

Pt-1 (19): Colorless amorphous solid; ¹H and ¹³C NMR data are shown in Table 2; LREIMS: *m/z* 332 (M⁺), 196 (base), 153, 137, 81, 69; HREIMS: *m/z* 332.1835 [M]⁺ (332.1848 calcd. for C₁₇H₂₄N₄O₃).

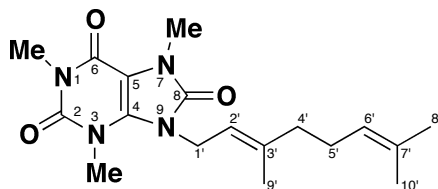
Pt-2 (20) の単離



Fraction 13 (36.0 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl₃, CHCl₃-MeOH (99:1-1:1), MeOH で順次溶出させ, Fraction 13-1~10 を得た. また, Fraction 14 (509.6 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl₃, CHCl₃-MeOH (99:1-1:1), MeOH で順次溶出させ, Fraction 14-1~13 を得た. Fraction 13-7 および 14-8 (50.9 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl₃, CHCl₃-MeOH (99:1-1:1), MeOH で順次溶出させ, Fraction 14-8-1~8 を得た. Fraction 14-8-5~6 (20.9 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーに付し, H₂O-MeOH (7:3-1:9), MeOH, MeOH-EtOAc (4:1), EtOAc で順次溶出させ, H₂O-MeOH (3:7-1:9) の溶出画分より Pt-2 (20) (9.7 mg) を得た.

Pt-2 (20): Colorless amorphous solid; ¹H and ¹³C NMR data are shown in Table 3; LREIMS: *m/z* 318 (M⁺), 182 (base), 137, 81, 69; HREIMS: *m/z* 318.1688 [M]⁺ (318.1692 calcd. for C₁₆H₂₂N₄O₃).

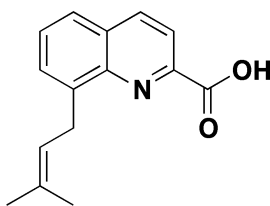
Pt-2 (20) のメチル化



Pt-2 (**20**) (2.0 mg, 6.3 μ mol) を DMF (1.0 mL) に溶かし, そこに K_2CO_3 (6.3 mg, 0.046 mmol) および MeI (10 μ L, 0.16 mmol) を順に加え, 室温にて 3 時間攪拌した. 反応液を 0.3 M 塩酸で酸性化し, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 溶媒を留去し, 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, CHCl_3 , CHCl_3 -MeOH (99:1-1:1) MeOH で順次溶出させ, CHCl_3 -MeOH (99:1) の溶出画分より **41** (1.9 mg, 5.5 μ mol, 87%) を得た.

41: Colorless amorphous solid; ^1H NMR (600 MHz, CDCl_3) δ 5.10 (1H, m, H-2'), 5.00 (1H, m, H-6'), 4.65 (2H, d, $J = 6.0$ Hz, H2-1'), 3.61 (3H, s, 3-NMe), 3.56 (3H, s, 7-NMe), 3.36 (3H, s, 1-NMe), 2.07 (2H, q, $J = 7.2$ Hz, H2-5'), 2.03 (2H, t, $J = 7.2$ Hz, H2-4'), 1.72 (3H, d, $J = 1.0$ Hz, H3-9'), 1.64 (3H, d, $J = 1.0$ Hz, H3-8'), 1.56 (3H, s, H3-10'); ^{13}C NMR (150 MHz, CDCl_3) δ 153.5 (C-6), 151.9 (C-8), 150.8 (C-2), 140.5 (C-3'), 135.4 (C-4), 132.3 (C-7'), 123.3 (C-6'), 119.6 (C-2'), 99.5 (C-5), 41.8 (C-1'), 39.2 (C-4'), 30.5 (3-NMe), 29.3 (7-NMe), 28.2 (1-NMe), 26.1 (C-5'), 25.7 (C-8'), 17.7 (C-10'), 16.7 (C-9'); LREIMS: m/z 346 (M^+), 210 (base), 153, 69; HREIMS: m/z 346.2012 [M] $^+$ (346.2005 calcd. for $\text{C}_{18}\text{H}_{26}\text{N}_4\text{O}_3$).

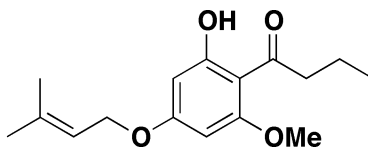
Pt-3 (21) の単離



Fraction 14-4 (7.6 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーに付し, H_2O -MeCN (9:1-1:4), MeCN, MeCN-EtOAc (4:1), EtOAc で順次溶出させ, H_2O -MeCN (1:1-1:4) の溶出画分より Pt-3 (**21**) (0.8 mg) を得た.

Pt-3 (**21**): Brown amorphous solid; ^1H and ^{13}C NMR data are shown in Table 4; LREIMS: m/z 241 (M^+), 198 (base), 194, 180, 154; HREIMS: m/z 241.1091 [M] $^+$ (241.1103 calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$).

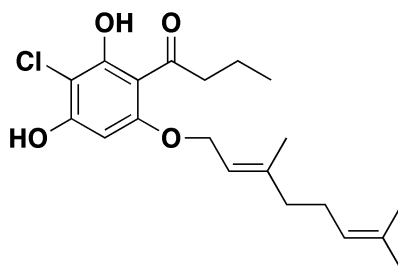
Pt-4 (22) の単離



Fraction 3 (717.5 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane, hexane-EtOAc (99:1-1:1), EtOAc, MeOH で順次溶出させ, Fraction 3-1~11 を得た. Fraction 3-4~5 (257.4 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane, hexane-EtOAc (99:1-1:1), EtOAc, MeOH で順次溶出させ, Fraction 3-4-1~11 を得た. Fraction 3-4-3~6 (148.1 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーに付し, H₂O-MeCN (3:7-1:4), MeCN, MeCN-EtOAc (1:1), EtOAc で順次溶出させ, H₂O-MeCN (3:7) の溶出画分より Pt-4 (22) (2.6 mg) を得た.

Pt-4 (22): Yellowish brown amorphous solid; ¹H and ¹³C NMR data are shown in Table 5; LREIMS: *m/z* 278 (M⁺), 210, 167(base), 69; HREIMS: *m/z* 278.1498 [M]⁺ (278.1518 calcd. for C₁₆H₂₂O₄).

Pt-5 (23) の単離

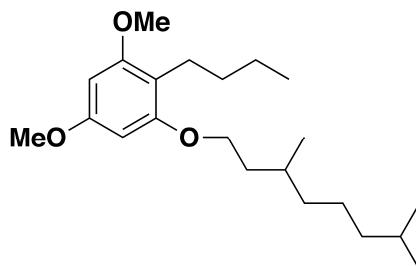


Fraction 5 (450.0 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane, hexane-EtOAc (19:1-1:1), EtOAc, MeOH で順次溶出させ, Fraction 5-1~8 を得た. Fraction 5-3 (229.6 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane, hexane-CHCl₃ (9:1-1:1), CHCl₃-MeOH (49:1-1:1), MeOH で順次溶出させ, Fraction 5-3-1~6 を得た. Fraction 5-3-3,4 (183.2 mg) を ODS カラムクロマトグラフィーに付し, H₂O-MeCN (1:1-1:9), MeCN, MeCN-EtOAc (1:1), EtOAc で順次溶出させ, Fraction 5-3-3-1~7 を得た. Fraction 5-3-3-1-2 (10.4 mg) をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane, hexane-CHCl₃ (1:1), CHCl₃-MeOH (4:1-2:1), MeOH で順次溶出させ, Fraction 5-3-3-1-2-1~5 を得た. Fraction 5-3-3-1-2-2 をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane, hexane-toluene (2:1-1:1), toluene, toluene-EtOAc (9:1-2:1), EtOAc, EtOAc-MeOH (9:1), MeOH で順次溶出させ hexane-toluene (1:1-0:1) の溶出画

分より Pt-5 (**23**) (4.7 mg) を得た.

Pt-5 (**23**): Pale yellow amorphous solid; ^1H and ^{13}C NMR data are shown in Table 6; LREIMS: m/z 368 ($M+2$), 366 (M^+), 232, 230, 189, 187, 137, 93, 81, 69 (base); HREIMS: m/z 366.1597 [M] $^+$ (366.1598 calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}^{35}\text{ClO}_4$).

Pt-5 (**23**) のメチル化および接触水素化



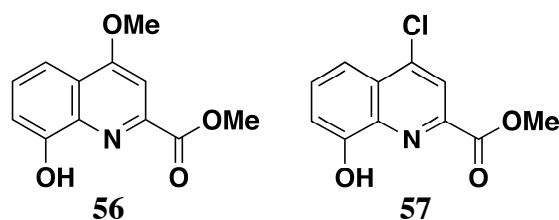
Pt-5 (**23**) (2.1 mg, 5.72 μmol) を DMF (1.0 mL) に溶かし, そこに K_2CO_3 (6.1 mg, 0.044 mmol) および MeI (10 μL , 0.16 mmol) を順に加え, 室温にて 1 時間攪拌した. 反応液を 0.3 M 塩酸で酸性化し, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した.

その残渣を MeOH (1.0 mL) に溶かし, 20% $\text{Pd}(\text{OH})_2$ on carbon (5.5 mg) を加え, 水素雰囲気下室温で 24 時間攪拌した. 反応液を濾過し, 減圧下溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane, hexane-EtOAc (49:1-9:1) で順次溶出させ, hexane-EtOAc (49:1) の溶出画分より **43** (1.0 mg, 2.9 μmol , 50%) を得た.

43: Colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.11 (2H, m), 3.92-3.98 (2H, m), 3.79 (3H, s), 3.78 (3H, s), 2.55 (2H, t, $J = 7.5$ Hz), 1.77-1.84 (1H, m), 1.70 (1H, m), 1.54 (2H, m), 1.42 (2H, m), 1.28-1.35 (6H, m), 1.13-1.18 (2H, m), 0.90-0.94 (6H, m), 0.86-0.88 (6H, m); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 158.9, 158.8, 158.3, 112.4, 91.4, 90.5, 66.4, 55.7, 55.3, 39.3, 37.3, 36.5, 31.9, 29.8, 28.0, 24.8, 22.8, 22.7, 22.6, 22.4, 19.6, 14.1; LREIMS: m/z 350 (M^+), 307 (base), 169, 167; HREIMS: m/z 350.28115 [M] $^+$ (350.28209 calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{38}\text{O}_3$).

第2章第1節の実験

Methyl-8-hydroxy-4-methoxyquinoline-2-carboxylate (**56**) の合成

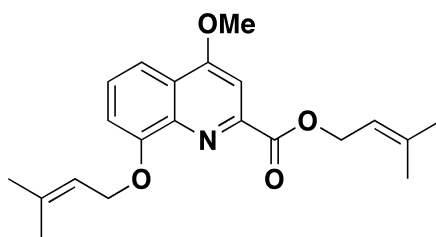


Xanthurenic acid (**55**) (310.1 mg, 1.51 mmol) を thionyl chloride (2.0 mL) に懸濁させ、15 時間加熱還流した後溶媒を留去した。その残渣に MeOH (2.0 mL) を加え、15 分間加熱還流した後溶媒を留去した。その残渣を MeOH (10 mL) に溶かし、NaOMe (408.2 mg, 7.56 mmol) を加え、2 時間加熱還流した。反応液を水に注ぎ 3 M 塩酸で酸性化した後、EtOAc で 3 回抽出した。有機層を集め、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-EtOAc (19:1-2:1) で順次溶出させ、hexane-EtOAc (19:1-14:1) の溶出画分より **57** (126.9 mg, 0.53 mmol, 35% for 3 steps), hexane-EtOAc (9:1-2:1) の溶出画分より **56** (57.3 mg, 0.25 mmol, 16% for 3 steps) を得た。

56: Pale yellow amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.41 (1H, br.s), 7.63 (1H, dd, $J = 1.2, 8.5$ Hz), 7.52 (1H, s), 7.48 (1H, dd, $J = 7.5, 8.5$ Hz), 7.20 (1H, dd, $J = 1.2, 7.5$ Hz), 4.10 (3H, s), 4.04 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 165.8, 163.6, 153.0, 146.6, 138.6, 128.9, 122.4, 112.0, 111.3, 100.6, 56.2, 52.9; LREIMS: m/z 233 (base, M^+), 201, 175, 173, 158, 145; HREIMS: m/z 233.0671 [M] $^+$ (233.0688 calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{11}\text{NO}_4$).

57: Pale yellow amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.56 (1H, br.s), 8.23 (1H, s), 7.70 (1H, dd, $J = 1.4, 8.5$ Hz), 7.65 (1H, dd, $J = 7.5, 8.5$ Hz), 7.28 (1H, dd, $J = 1.4, 7.5$ Hz), 4.06 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 164.6, 153.6, 144.9, 144.1, 138.4, 131.2, 128.0, 121.7, 114.3, 112.1, 53.1; LREIMS: m/z 239 ($\text{M}+2$), 237 (base, M^+), 207, 205, 179, 177, 149; HREIMS: m/z 237.0186 [M] $^+$ (237.0192 calcd. for $\text{C}_{11}\text{H}_8^{35}\text{ClNO}_3$).

Ppc-1 (18) の合成

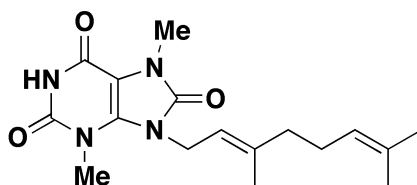


56 (22.8 mg, 0.098 mmol) を MeOH (2.0 mL) に溶かし、水 (0.2 mL) および NaOH (100 mg, 2.5 mmol) を加え、30 分加熱還流した。反応液を水に注ぎ 3 M 塩酸で酸性化した後、EtOAc で 3 回抽出した。有機層を集め、飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。

その残渣 (21.6 mg) のうち 11.0 mg を DMF (1.0 mL) に溶かし、K₂CO₃ (30.1 mg, 0.22 mmol) および 1-bromo-3-methyl-2-butene (**58**) (20 μ L, 0.17 mmol) を加え、室温にて 14 時間攪拌した。飽和塩化アンモニウム水溶液で酸性化した後、EtOAc で 3 回抽出した。有機層を集め、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-EtOAc (1:0-19:1) で順次溶出させ、hexane-EtOAc (19:1) の溶出画分より **18** (15.6 mg, 0.044 mmol, 87% for 2 steps) を得た。**18**: Pale yellow amorphous solid; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.75 (1H, dd, J = 1.2, 8.5 Hz), 7.59 (1H, s), 7.48 (1H, dd, J = 8.0, 8.5 Hz), 7.07 (1H, dd, J = 1.2, 8.0 Hz), 5.70 (1H, m), 5.58 (1H, m), 4.95 (2H, d, J = 7.3 Hz), 4.80 (2H, d, J = 6.5 Hz), 4.10 (3H, s), 1.78-1.80 (12H, m); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.8, 163.0, 155.1, 148.0, 140.5, 138.8, 136.8, 127.8, 123.3, 119.9, 118.6, 113.0, 109.9, 100.6, 66.2, 63.1, 56.1, 25.88, 25.86, 18.4, 18.2; LREIMS: m/z 355 (M⁺), 286, 219 (base), 201, 173; HREIMS: m/z 355.1783 [M]⁺ (355.1782 calcd. for C₂₁H₂₅NO₄). これらのスペクトルデータは全て文献値¹³ と一致した。

第2章第2節の実験

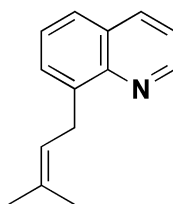
Pt-1 (19) の合成



3,7-Dimethyluric acid (**59**) (50.4 mg, 0.26 mmol) を DMF (3.0 mL) に溶かし, K_2CO_3 (72.3 mg, 0.52 mmol) および geranyl bromide (**60**) (50 μL , 0.24 mmol) を加え, 室温にて 1.5 時間攪拌した. 反応液を水に注ぎ, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (9:1-0:1) で順次溶出させ, hexane-EtOAc (2:1-0:1) 溶出画分を集め溶媒留去した. 残渣を GPC HPLC (Column: GS-310, Eluent: CHCl_3 , WL: 250 nm, flow rate: 5 mL/min) で分離・精製し, Pt-1 (**19**) (2.6 mg, 7.8 μmol , 3.0%) を得た. Pt-1 (**19**): Colorless amorphous solid; LREIMS: m/z 332 (M^+), 196 (base), 153, 137, 81, 69; HREIMS: m/z 332.1851 [M] $^+$ (332.1848 calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_3$). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは, 天然由来のものと完全に一致した (Table 2).

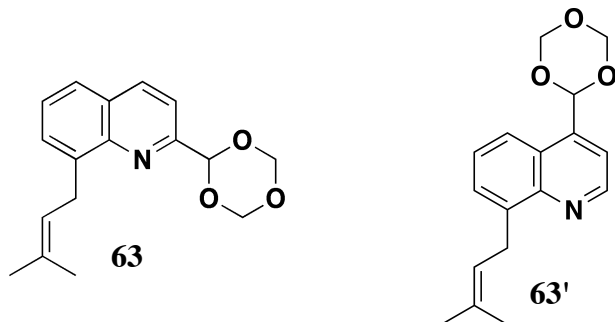
第2章第3節の実験

8-(3-Methylbut-2-enyl)quinoline (**62**) の合成



8-Quinolineboronic acid (**61**) (508.0 mg, 2.94 mmol) を dioxane (10 mL) に溶かし, bis(dibenzylideneacetone)palladium(0) (24.9 mg, 0.043 mmol), tricyclohexylphosphine (29.2 mg, 0.10 mmol), Cs₂CO₃ (1883.5 mg, 5.78 mmol) および 1-bromo-3-methyl-2-butene (**58**) (350 μ L, 3.03 mmol) を加え, 80 °C にて 6 時間攪拌した. 反応液を水に注ぎ, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (49:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (49:1) で溶出した画分より **62** (294.6 mg, 1.49 mmol, 52%) を得た. **62**: Yellow oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.94 (1H, dd, J = 1.8, 4.2 Hz), 8.10 (1H, dd, J = 1.8, 8.2 Hz), 7.64 (1H, dd, J = 1.3, 8.2 Hz), 7.55 (1H, m), 7.45 (1H, dd, J = 7.3, 8.0 Hz) 7.37 (1H, dd, J = 4.2, 8.0 Hz), 5.51 (1H, m), 4.02 (2H, br.d, J = 7.3 Hz) 1.77-1.78 (6H, m); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 149.1, 146.6, 140.3, 136.2, 132.8, 128.3, 128.2, 126.3, 125.7, 122.7, 120.7, 29.6, 25.9, 17.9; LREIMS: m/z 197 (M⁺), 182, 168, 154 (base), 142, 129; HREIMS: m/z 197.1178 [M]⁺ (197.1204 calcd. for C₁₄H₁₅N).

8-(3-Methylbut-2-enyl)-2-(1,3,5-trioxan-2-yl)quinoline (**63**) の合成



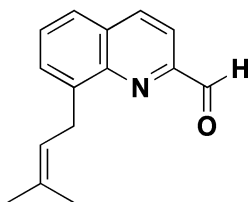
化合物 **62** (400.0 mg, 2.03 mmol) を acetonitrile (20 mL) に溶かし, trioxane (14.6 g, 163

mmol), $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (7.9 mg, 0.028 mmol), trifluoroacetic acid (155 μL , 2.08 mmol), および $t\text{BuOOH}$ (70% solution in H_2O) (870 μL , 6.28 mmol) を順に加え, 5 時間加熱還流した. 1 N NaOH 水溶液にてアルカリ化した後, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (99:1-19:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (99:1-49:1) で溶出した画分より **62** (90.4 mg, 0.46 mmol), hexane-EtOAc (49:1) で溶出した画分より **63** (69.4 mg, 0.24 mmol, 12%), hexane-EtOAc (19:1) で溶出した画分より **63'** (63.0 mg, 0.22 mmol, 11%) を得た.

63: Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.21 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.80 (1H, d, $J = 8.5$ Hz), 7.66 (1H, dd, $J = 1.5, 8.1$ Hz), 7.55 (1H, m), 7.47 (1H, dd, $J = 7.3, 8.1$ Hz), 6.12 (1H, s), 5.48 (1H, m), 5.41 (4H, s), 4.02 (2H, br.d, $J = 7.4$ Hz), 1.79 (3H, br.s), 1.76 (3H, d, $J = 1.0$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 154.1, 145.6, 140.8, 137.5, 132.7, 128.6, 128.5, 127.0, 125.5, 123.0, 118.1, 103.1, 93.6 (2C), 29.4, 25.8, 17.9; LREIMS: m/z 285 (M^+), 256, 239, 225, 210, 197, 183, 168, 155 (base); HREIMS: m/z 285.1336 [M] $^+$ (285.1365 calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$).

63': Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 9.00 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 7.97 (1H, dd, $J = 1.4, 8.4$ Hz), 7.69 (1H, d, $J = 4.4$ Hz), 7.56 (1H, d, $J = 1.4, 7.0$ Hz), 7.50 (1H, dd, $J = 7.0, 8.4$ Hz), 6.43 (1H, s), 5.48 (1H, m), 5.45 (4H, s), 4.02 (2H, br.d, $J = 7.2$ Hz), 1.77 (6H, br.s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 148.9, 146.9, 141.0, 140.3, 132.9, 128.1, 126.7, 124.9, 122.7, 121.4, 118.1, 98.8, 93.7 (2C), 30.0, 25.9, 18.0; LREIMS: m/z 285 (base, M^+), 270, 242, 225, 210, 197, 182; HREIMS: m/z 285.1365 [M] $^+$ (285.1365 calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$).

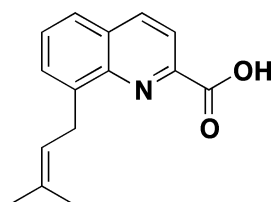
8-(3-Methylbut-2-enyl)quinoline-2-carbaldehyde (**64**) の合成



化合物 **63** (49.7 mg, 0.17 mmol) を水 (3.0 mL) に懸濁させ, p -toluenesulfonic acid (37.8 mg, 0.22 mmol) を加え, 1.5 時間加熱還流した. 飽和炭酸水素ナトリウム水溶液にて中和した

後, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (99:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (99:1) で溶出した画分より **64** (2.0 mg, 8.88 μ mol, 5.1%), および原料 **63** (40.4 mg, 0.14 mmol, 81%) を得た. **64**: Brown oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.24 (1H, d, $J = 0.8$ Hz), 8.27 (1H, dd, $J = 0.8, 8.4$ Hz), 8.01 (1H, d, $J = 8.4$ Hz), 7.73 (1H, dd, $J = 1.5, 8.1$ Hz), 7.65 (1H, m), 7.59 (1H, dd, $J = 7.4, 8.1$ Hz) 5.50 (1H, m), 4.10 (2H, br.d, $J = 7.5$ Hz) 1.84 (3H, br.s), 1.76 (3H, d, $J = 1.1$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 194.1, 151.4, 146.2, 142.0, 137.3, 132.9, 130.1, 129.2, 129.0, 125.6, 122.5, 116.8, 29.6, 25.8, 18.0; LREIMS: m/z 225 (M^+), 210, 182, 167, 155 (base), 149; HREIMS: m/z 285.1336 [M] $^+$ (285.1365 calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{NO}_3$).

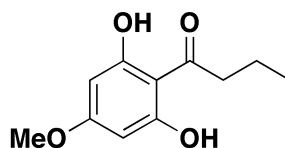
Pt-3 (**21**) の合成



化合物 **64** (4.0 mg, 18 μ mol) を $t\text{BuOH}$ (1.0 mL) に溶かし水 (0.2 mL), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4.2 mg, 27 μ mol), 2-methyl-2-butene (10 μL , 94 μ mol) および NaClO_2 (2.2 mg, 20 μ mol), を順に加え, 室温にて 1.5 時間攪拌した. 飽和塩化アンモニウム水溶液にて中和した後, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:0-9:1) で溶出させ, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (49:1-9:1) で溶出した画分より Pt-3 (**21**) (2.6 mg, 11 μ mol, 61%) を得た. Pt-3 (**21**): Colorless oil; : m/z 241 (M^+), 198 (base), 149; HREIMS: m/z 241.1081 [M] $^+$ (241.1103 calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{NO}_2$). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは, 天然由来のものと完全に一致した (Table 4).

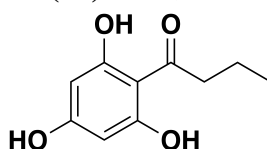
第2章第4節の実験

1-(2,6-Dihydroxy-4-methoxyphenyl)butan-1-one (**67**) の合成



5-Methoxyresorcinol (**65**) (1.96 g, 14.0 mmol) を CH₂Cl₂ (40 mL) に懸濁させ、0 °C において aluminium chloride (3.74 g, 28.0 mmol) および butyryl chloride (**66**) (1.5 mL, 14.4 mmol) を加え、1 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ、EtOAc で 3 回抽出した。有機層を集め、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-EtOAc (19:1-0:1) で溶出させ、hexane-EtOAc (19:1) 溶出画分を集め溶媒留去した。残渣を CHCl₃ より再結晶させることで **67** (2.38 g, 11.3 mmol, 81%) を得た。**67**: Colorless amorphous solid; ¹H NMR (400 MHz, acetone-*d*₆) δ 11.79 (2H, br.s), 5.96 (2H, s), 3.77 (3H, s), 3.04 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 1.66 (2H, sext, *J* = 7.5 Hz), 0.94 (3H, t, *J* = 7.5 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.4, 166.7 (2C), 165.1, 105.7, 94.3 (2C), 55.7, 46.4, 18.6, 14.2; LREIMS: *m/z* 210 (*M*⁺), 195, 167(base); HREIMS: *m/z* 210.0890 [*M*]⁺ (210.0892 calcd. for C₁₁H₁₄O₄).

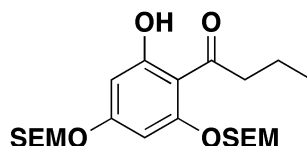
1-(2,4,6-Trihydroxyphenyl)butan-1-one (**51**) の合成



化合物 **67** (793.1 mg, 3.77 mmol) を CH₂Cl₂ (20 mL) に懸濁させ、-80 °C に冷却後 borane tribromide (1 M solution in CH₂Cl₂) (20 mL, 20 mmol) を加え、室温まで昇温した後 2 時間攪拌した。反応液に飽和炭酸水素ナトリウム水溶液を加え EtOAc で 3 回抽出した。有機層を集め飽和炭酸水素ナトリウム水溶液、水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-EtOAc (9:1-1:1) で溶出させ、hexane-EtOAc (4:1-1:1) で溶出した画分より **51** (700.8 mg, 3.57 mmol, 95%) を得た。**51**: Pale yellow amorphous solid; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃-

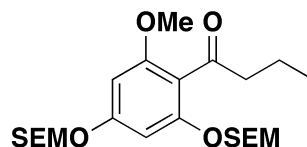
CD₃OD (9:1)) δ 5.85 (2H, s), 3.05 (2H, t, $J = 7.2$ Hz), 1.70 (2H, sext, $J = 7.2$ Hz), 0.98 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-CD₃OD (9:1)) δ 206.5, 164.1, 163.7 (2C), 104.5, 94.9 (2C), 45.6, 18.1, 13.8; LREIMS: m/z 196 (M^+), 181, 153(base); HREIMS: m/z 196.0729 [M]⁺ (196.0736 calcd. for C₁₀H₁₂O₄).

1-[2-Hydroxy-4,6-bis[(2-trimethylsilylethoxy)methoxy]phenyl]butan-1-one (68) の合成



化合物 **67** (205.4 mg, 1.05 mmol) を CH₂Cl₂ (4.0 mL) に懸濁させ、DIPEA (400 μ L, 2.30 mmol), SEMCl (400 μ L, 2.26 mmol) を加え室温にて 2.5 時間攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え EtOAc で 3 回抽出した。有機層を集め飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-EtOAc (49:1-19:1) で溶出させ、hexane-EtOAc (49:1-19:1) で溶出した画分より **68** (411.0 mg, 0.90 mmol, 86%) を得た。**68**: Pale orange oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 13.79 (1H, s), 6.26 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 6.25 (1H, d, $J = 2.4$ Hz), 5.28 (2H, s), 5.20 (2H, s), 3.71-3.80 (4H, m), 2.99 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.70 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz), 0.93-1.01 (7H, m), 0.01 (9H, s), 0.00 (9H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 205.9, 166.8, 163.4, 160.4, 106.7, 97.2, 94.1, 92.9, 92.5, 67.1, 66.7, 46.2, 18.2, 18.01, 18.00, 14.0, -1.44, -1.45; LREIMS: m/z 456 (M^+), 398, 355, 340, 325, 297, 281, 103, 73(base); HREIMS: m/z 456.2361 [M]⁺ (456.2363 calcd. for C₂₂H₄₀O₆Si₂).

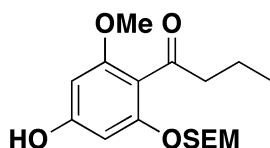
1-[2-Methoxy-4,6-bis[(2-trimethylsilylethoxy)methoxy]phenyl]butan-1-one (69) の合成



化合物 **68** (187.7 mg, 0.41 mmol) を acetone-DMF (1:1) (4.0 mL) に溶かし、K₂CO₃ (248.7 mg, 2.30 mmol), および MeI (75 μ L, 1.20 mmol) を加え、室温にて 6 時間攪拌した。反応液を水に注ぎ EtOAc で 3 回抽出した。有機層を集め水および飽和食塩水で洗浄後、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに

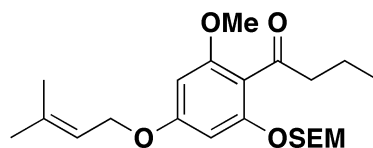
付し, hexane-EtOAc (49:1-9:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (49:1-9:1) で溶出した画分より **69** (473.4 mg, 0.37 mmol, 90%) を得た. **69**: Colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.48 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), 6.30 (1H, d, $J = 1.9$ Hz), , 5.20 (2H, s), 5.16 (2H, s), 3.69-3.77 (4H, m), 3.76 (3H, s), 2.71 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.68 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz), 0.92-0.98 (7H, m), 0.01 (9H, s), 0.00 (9H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 204.5, 159.7, 157.6, 155.4, 115.5, 95.9, 93.6, 93.0, 92.9, 66.38, 66.33, 55.7, 46.9, 18.0, 17.9, 17.3, 13.7, -1.44, -1.48; LREIMS: m/z 470 (M^+), 397, 369, 354, 339, 311(base), 295, 103, 73; HREIMS: m/z 470.2519 [M] $^+$ (470.2520 calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{42}\text{O}_6\text{Si}_2$).

1-[4-Hydroxy-2-methoxy-6-[(2-trimethylsilylethoxy)methoxy]phenyl]butan-1-one (**70**) の合成



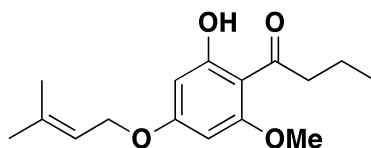
化合物 **69** (40.0 mg, 0.085 mmol) を HMPA (2.0 mL) に溶かし, TBAF (1M solution in THF) (250 μL , 0.25 mmol) を加え, 50 $^{\circ}\text{C}$ にて 4 時間攪拌した. 反応液を EtOAc で希釈し水に注ぎ EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (9:1-4:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (4:1) 溶出画分を集めた. 残渣を GPC HPLC (Column: GS-310, Eluent: EtOAc, WL: 250 nm, flow rate: 5 mL/min) で分離・精製し, **70** (6.6 mg, 0.019 mmol, 23%) を得た. **70**: Colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.26 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.07 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.66 (1H, br.s), 5.13 (2H, s), 3.69-3.73 (2H, m), 3.71 (3H, s), 2.71 (2H, t, $J = 7.3$ Hz), 1.69 (2H, sext, $J = 7.3$ Hz), 0.92-0.96 (5H, m), 0.00 (9H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 205.1, 158.23, 158.16, 155.8, 114.2, 95.0, 92.95, 92.94, 66.5, 55.7, 47.0, 18.0, 17.5, 13.8, -1.47; LREIMS: m/z 340 (M^+), 311, 282, 267, 239 (base), 210, 167, 73; HREIMS: m/z 340.1714 [M] $^+$ (340.1706 calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{O}_5\text{Si}$).

1-[2-Methoxy-4-(3-methylbut-2-enyloxy)-6-[(2-trimethylsilylethoxy)methoxy]phenyl]butan-1-one (**71**) の合成



化合物 **70** (14.9 mg, 0.044 mmol) を DMF (1.0 mL) に溶かし, K_2CO_3 (18.1 mg, 0.13 mmol), および 1-bromo-3-methyl-2-butene (**58**) (20 μL , 0.17 mmol) を加え, 室温にて 3 時間撹拌した. 反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (49:1-2:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (19:1-9:1) で溶出した画分より **71** (10.8 mg, 0.026 mmol, 60%) を得た. **71**: Colorless oil; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 6.36 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.15 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.46 (1H, m), 5.16 (2H, s), 4.49 (2H, d, $J = 6.9$ Hz), 3.74 (3H, s), 3.70-3.73 (2H, m), 2.71 (2H, t, $J = 7.4$ Hz), 1.79 (3H, d, $J = 0.9$ Hz), 1.75 (3H, d, $J = 1.0$ Hz), 1.67 (2H, sext, $J = 7.4$ Hz), 0.91-0.96 (5H, m), 0.00 (9H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 204.6, 161.1, 157.8, 155.7, 138.6, 119.2, 114.7, 93.9, 93.2, 92.9, 66.4, 64.9, 55.7, 47.0, 25.8, 18.2, 18.0, 17.4, 13.8, -1.43; LREIMS: m/z 408 (M^+), 378, 350, 335, 307, 267, 239 (base), 223, 167, 73; HREIMS: m/z 408.2346 [M] $^+$ (408.2332 calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{36}\text{O}_5\text{Si}$).

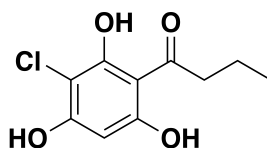
Pt-4 (**22**) の合成



化合物 **71** (10.8 mg, 0.026 mmol) を HMPA (1.0 mL) に溶かし, TBAF (1 M solution in THF) (50 μL , 0.05 mmol) を加え, 室温にて 4 時間撹拌した. 反応液を EtOAc で希釈し水に注ぎ EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (19:1-2:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (19:1) で溶出した画分より Pt-4 (**22**) (3.3 mg, 0.012 mmol, 45%) を得た. **22**: Colorless oil; LREIMS: m/z 278 (M^+), 210, 167 (base), 69; HREIMS: m/z 278.1492 [M] $^+$ (278.1518 calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$). ^1H および ^{13}C NMR スペクトルは, 天然由来のものと完全に一致した (Table 5).

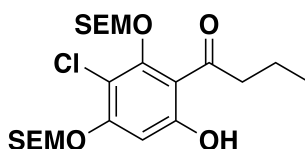
第2章第5節の実験

1-(3-Chloro-2,4,6-trihydroxyphenyl)butan-1-one (72) の合成



化合物 **67** (106.3 mg, 0.54 mmol) を CHCl₃-EtOH (100:1) (5.0 mL) に懸濁させ、0 °C にて SO₂Cl₂ (70.0 mg, 0.52 mmol) を加え 30 分攪拌し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、CHCl₃-MeOH (1:0-4:1) で溶出させ、CHCl₃-MeOH (1:0-9:1) で溶出した画分より **72** (119.2 mg, 0.51 mmol, 95%) を得た。**72**: Pale yellow amorphous solid; ¹H NMR [400 MHz, CDCl₃-CD₃OD (9:1)] δ 6.03 (1H, s), 3.06 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.71 (2H, sext, *J* = 7.3 Hz), 0.98 (3H, t, *J* = 7.3 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃-CD₃OD (9:1)) δ 206.3, 171.8, 161.5, 158.6, 104.7, 99.1, 95.1, 45.7, 17.9, 13.6; LREIMS: *m/z* 232 (*M*+2), 230 (*M*⁺), 189, 187(base); HREIMS: *m/z* 230.0335 [*M*]⁺ (230.0246 calcd. for C₁₀H₁₁³⁵ClO₄).

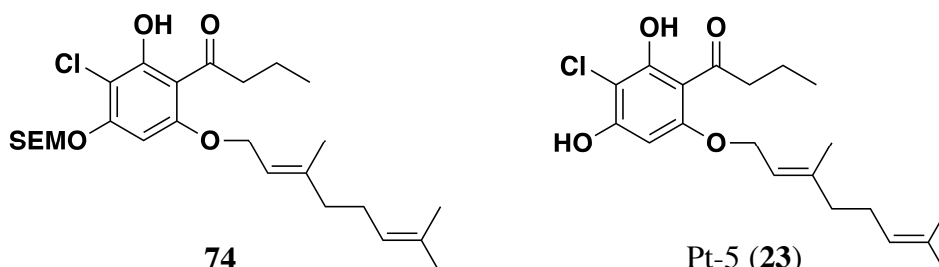
1-[3-Chloro-2-hydroxy-4,6-bis[(2-trimethylsilylethoxy)methoxy]phenyl]butan-1-one (73) の合成



化合物 **72** (80.3 mg, 0.35 mmol) を CH₂Cl₂ (2.0 mL) に懸濁させ、DIPEA (130 μL, 0.75 mmol), SEMCl (130 μL, 0.73 mmol) を加え、室温にて 30 分攪拌した。反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え EtOAc で 3 回抽出した。有機層を集め水および飽和食塩水で洗浄し、無水硫酸ナトリウムで乾燥し、溶媒を留去した。残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し、hexane-EtOAc (99:1-49:1) で溶出させ、hexane-EtOAc (99:1) で溶出した画分より **73** (91.0 mg, 0.19 mmol, 53%) を得た。**73**: Colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 12.99 (1H, s), 6.59 (1H, s), 5.30 (2H, s), 5.20 (2H, s), 3.75-3.81 (4H, m), 3.14 (2H, t, *J* = 7.3 Hz), 1.70 (2H, sext, *J* = 7.3 Hz), 0.92-0.98 (7H, m), 0.00 (18H, m); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.6, 163.2, 158.7, 155.7, 111.8, 108.5, 100.3, 99.0, 93.4, 68.9, 67.2, 45.2, 18.2, 17.98, 17.97, 13.8, -1.45, -1.50; LREIMS: *m/z* 490 (*M*⁺), 361, 359 (base), 333, 331, 103, 73; HREIMS: *m/z* 490.2012

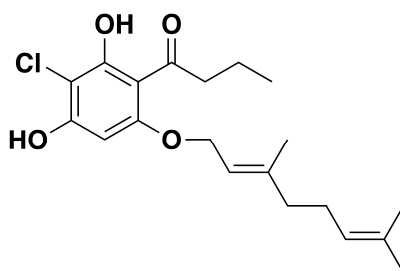
[M]⁺ (490.2012 calcd. for C₂₂H₃₉³⁵ClO₆Si₂).

(E)-1-[3-Chloro-6-(3,7-dimethylocta-2,6-dienyloxy)-2-hydroxy-4-[(2-trimethylsilyl ethoxy)methoxy]phenyl]butan-1-one (74) および Pt-5 (23) の合成



化合物 **73** (70.3 mg, 0.14 mmol) を DMF (1.0 mL) に溶かし, K₂CO₃ (39.8 mg, 0.29 mmol), geranyl bromide (**60**) (30 μ L, 0.14 mmol) を加え, 室温にて 1.5 時間攪拌した. 反応液に飽和塩化アンモニウム水溶液を加え EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め水および飽和食塩水で洗浄し, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (99:1-4:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (99:1) で溶出した画分より **74** (17.5 mg, 0.035 mmol, 25%) を得た. また, hexane-EtOAc (49:1-9:1) 溶出画分を集め, 残渣を GPC HPLC (Column: GS-310, Eluent: CHCl₃, WL: 250 nm, flow rate: 5 mL/min) で分離・精製し, Pt-5 (**23**) (10.1 mg, 0.028 mmol, 19%) を得た. **74**: Colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 14.51 (1H, s), 6.33 (1H, s), 5.48 (1H, m), 5.33 (2H, s), 5.07 (1H, m), 4.58 (2H, d, *J* = 6.8 Hz), 3.78-3.82 (2H, m), 2.98 (2H, t, *J* = 7.5 Hz), 2.07-2.15 (2H, m), 1.75 (3H, br,s), 1.62-1.70 (5H, m), 1.59 (3H, br.s), 0.93-0.97 (5H, m), 0.00 (9H, s); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 206.5, 161.8, 160.5, 158.9, 142.7, 132.0, 123.5, 118.0, 107.0, 103.5, 93.2, 90.7, 67.1, 65.8, 64.9, 46.6, 39.5, 26.3, 25.6, 18.3, 18.1, 17.7, 16.7, 13.9, -1.41; LREIMS: *m/z* 498 (M+2), 496 (M⁺), 362, 360, 304, 302 (base), 261, 259, 137, 81, 73, 69; HREIMS: *m/z* 496.2397 [M]⁺ (496.2412 calcd. for C₂₆H₄₁³⁵ClO₅Si). **23**: Colorless amorphous solid; LREIMS: *m/z* 368 (M+2), 366 (M⁺), 232, 230, 189, 187, 137, 93, 81, 69 (base); HREIMS: *m/z* 366.1581 [M]⁺ (366.1598 calcd. for C₂₀H₂₇³⁵ClO₄). ¹H および ¹³C NMR スペクトルは, 天然由来のものと完全に一致した (Table 6).

Pt-5 (23) の合成 (74 より)



化合物 **74** (10.0 mg, 20 μmol) を HMPA (1.0 mL) に溶かし, TBAF (1M solution in THF) (30 μL , 30 μmol) を加え 50 $^{\circ}\text{C}$ にて 4 時間攪拌した. 反応液を EtOAc で希釈し水に注ぎEtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (19:1-9:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (19:1) で溶出した画分より原料 **74** (1.8 mg, 3.6 μmol , 18%) を得た. また, hexane-EtOAc (19:1-9:1) で溶出した画分よりPt-5 (**23**) (4.0 mg, 11 μmol , 54%) を得た. 各種データは前述のものと一致した.

第2章第6節の実験

各種活性試験は、群馬大学生体調節研究所准教授 久保原 禪先生に依頼し、以下のように行った。

K562, HeLa, 3T3-L1 細胞を用いた細胞増殖抑制活性の評価

1. 培地の調製

K562 細胞の培地は RPMI1640 medium に FCS を 10% (v/v), penicillin を 25 mg/mL, streptomycin を 50 mg/mL になるように加えて調製した。HeLa 細胞 および 3T3-L1 細胞の培地は DMEM-HG (4.5 g/L glucose) に ,FCS を 10% (v/v), penicillin を 75 µg/mL, streptomycin を 50 µg/mL になるように加えて調製した。

2. 細胞の培養

K562 細胞については 12 well plate の各 well に試料あるいは溶媒 (DMSO) を添加した培地を 1 mL ずつ分注し、その中に 2×10^4 cells/well, になるように蒔いた。(blank には細胞を蒔かないものとした)。72 時間培養後, Alamar Blue (cell number indicator) を各 well に 50 µL ずつ分注し, 37 °C で 1-2 時間培養した。

HeLa 細胞および 3T3-L1 細胞については 12 well plate の各 well に試料あるいは溶媒 (DMSO) を添加した培地を 1 mL ずつ分注し、その中に 2×10^4 cells/well, になるように蒔いた。(blank には細胞を蒔かないものとした)。72 時間培養後, 培地を捨て新たに Alamar Blue (cell number indicator) を 5% (v/v) 含んだ培地を各 well に 1 mL ずつ分注し, 37 °C で 1-2 時間培養した。

3. 生細胞数の測定

培養後各サンプル溶液を 200 µL ずつ 96 well plate に分注し, MICRO PLATEREADER MODEL 550 (BIO-RAD) を用いて 570 nm および 595 nm における吸光度を測定した (595 nm における吸光度を基準とした)。

4. データ処理

各 well の 570 nm における吸光度から 595 nm における吸光度を差し引き、生細胞数の指標とした。培地に DMSO のみを添加した control を 100% とし、培地のみで細胞を蒔いていない blank を 0% とし、各試料の平均値 \pm S.E を算出した。

3T3-L1 細胞を用いた糖代謝促進作用の評価

1. 培地の調製

培地は DMEM-HG (4.5 g/L glucose) に FCS を 10% (v/v), penicillin を 75 μ g/mL, streptomycin を 50 μ g/mL になるように加えて調製した (以後 DMEM-HG と表記する)。また、DMEM-MG (2.0 g/L glucose) に FCS を 10% (v/v), penicillin を 75 μ g/mL, streptomycin を 50 μ g/mL, Hepes-NaOH を 10 mM, pH 7.4 になるように加えて調製した (以後 DMEM-MG と表記する)。

2. 細胞の培養

12 well plate の各 well に DMEM-HG を 1 mL 加え 3T3-L1 細胞を蒔いた。2 日毎に培地を新しくしながら、細胞が各 well にコンフルエントになるまで 5-6 日間培養した。培地を DMEM-MG に替え 1 日毎に培地を新しくしながら 2-3 日前培養した。12 well plate の各 well に試料あるいは溶媒 (DMSO) を添加した DMEM-MG を 1 mL ずつ分注し、4 時間培養した。

3. glucose 濃度の測定

培養後各サンプル溶液のグルコース濃度を blood glucose test meter と censor chip (Sanwa Chemical Institute) を用いて測定した。

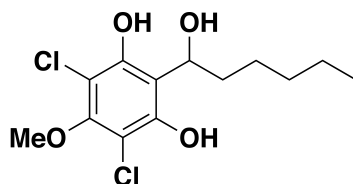
4. データ処理

DMEM-MG におけるグルコース濃度 (2.0 g/L) を基準とし、DMSO を添加した培地にお

ける glucose 残量を引いた値を 1 とし，各試料を加えた培地における glucose 消費量の平均値 \pm S.E を算出した．

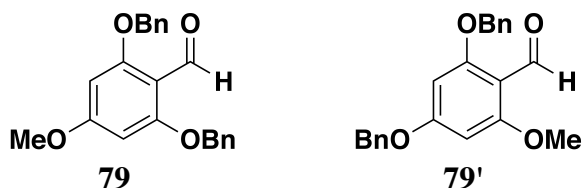
第 3 章第 1 節の実験

4,6-Dichloro-2-(1-hydroxyhexyl)-5-methoxybenzene-1,3-diol (**33**) の合成



DIF-1 (**3**)¹³ (49.7 mg, 0.162 mmol) を MeOH (2.0 mL) に溶かし, 0 °C にて sodium borohydride (6.2 mg, 0.164 mmol) を加え 30 分攪拌した. 反応液に 0.5 M 塩酸を加え酸性化した後, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (9:1-1:1) で順次溶出させ, hexane-EtOAc (4:1-1:1) で溶出した画分より **33** (34.7 mg, 0.112 mmol, 69%) を得た. **33**: Colorless oil; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 (2H, br.s), 5.30 (1H, m), 3.88 (3H, s), 2.98 (1H, br.s), 1.82-1.91 (1H, m), 1.69-1.77 (1H, m), 1.46-1.54 (1H, m), 1.24-1.39 (5H, m), 0.88 (3H, t, *J* = 6.9 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 151.7, 149.4 (2C), 112.2, 107.6 (2C), 70.6, 60.8, 36.2, 31.5, 25.1, 22.5, 14.0; LREIMS: *m/z* 312 (M+4), 310 (M+2), 308 (M⁺), 294, 292, 290, 251, 249, 247 (base), 241, 239, 237, 225, 223, 221, 208; HREIMS: *m/z* 308.0580 [M]⁺ (308.0582 calcd. for C₁₃H₁₈³⁵Cl₂O₄).

2,6-Bis(benzyloxy)-4-methoxybenzaldehyde (**79**) の合成



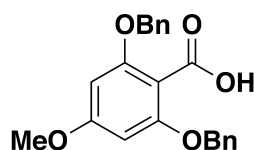
2,4,6-Trihydroxybenzaldehyde (**77**) (1.93 g, 10.2 mmol) を acetone-H₂O (1:1) (100 mL) に懸濁させ, K₂CO₃ (7.11 g, 51.4 mmol) および dimethyl sulfate (1.00 mL, 10.6 mmol) を加え, 室温にて 1.5 時間攪拌した. 反応液を飽和炭酸水素ナトリウム (50 mL) に注ぎ, 3 M 塩酸で酸性化した後, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付

し, hexane-EtOAc (9:1-2:1) で溶出させ, hexane-EtOAc (17:3) 溶出画分を得た. 残渣を DMF (20 mL) に溶かし, K_2CO_3 (2.31 g, 16.7 mmol) および benzyl bromide (1.40 mL, 11.8 mmol) を加え, 室温にて 4 時間攪拌した. 反応液に 3 M 塩酸を加え酸性化した後, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane-EtOAc (9:1-2:1) で順次溶出させ, hexane-EtOAc (9:1) の溶出画分より **79** (830 mg, 2.38 mmol, 23% for 2 steps), hexane-EtOAc (4:1-2:1) の溶出画分より **79'** (773 mg, 2.38 mmol, 22% for 2 steps)を得た.

79: Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.50 (1H, s), 7.28-7.47 (10H, m), 6.12 (2H, s), 5.13 (4H, s), 3.76 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 187.3, 165.8, 162.9 (2C), 136.1 (2C), 128.5 (4C), 127.9 (2C), 126.8 (4C), 109.6, 92.1 (2C), 70.5 (2C), 55.4; LREIMS: m/z 348 (M^+), 257, 240, 91 (base); HREIMS: m/z 348.1346 [M] $^+$ (348.1362 calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_4$).

79': Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.44 (1H, s), 7.30-7.43 (10H, m), 6.21 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 6.16 (1H, d, $J = 2.0$ Hz), 5.11 (2H, s), 5.07 (2H, s), 3.84 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 187.5, 165.1, 163.5, 163.3, 136.0, 135.7, 128.7 (2C), 128.6 (2C), 128.3, 128.0, 127.5 (2C), 126.9 (2C), 109.3, 92.4, 91.6, 70.6, 70.3, 55.9; LREIMS: m/z 348 (M^+), 319, 257, 91 (base); HREIMS: m/z 348.1354 [M] $^+$ (348.1362 calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_4$).

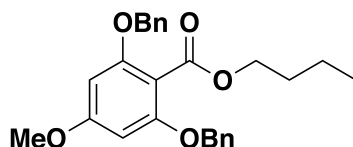
2,6-Bis(benzyloxy)-4-methoxybenzoic acid (**80**) の合成



化合物 **79** (707 mg, 2.03 mmol) を $t\text{-BuOH-H}_2\text{O}$ (3:1) (20 mL) に溶かし, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (479.6 mg, 3.07 mmol), 2-methyl-2-butene (1.75 mL, 16.5 mmol) および NaClO_2 (1.27 g, 11.2 mmol) を順に加え, 室温にて 3 時間攪拌した. 飽和炭酸ナトリウム水溶液でアルカリ化した後, EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め 3 M 塩酸で酸性化し, EtOAc で 3 回抽出し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, $\text{CHCl}_3\text{-MeOH}$ (1:0-19:1) で溶出させ, CHCl_3 で溶出した画分より **80** (620 mg, 1.70 mmol, 84%) を得

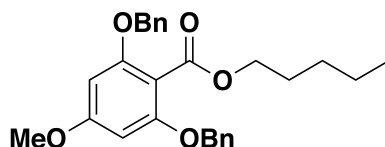
た. **80**: Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.23-7.46 (10H, m), 6.15 (2H, s), 5.10 (4H, s), 3.70 (3H, s); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.0, 163.0, 159.0 (2C), 136.1 (2C), 128.5 (4C), 127.9 (2C), 127.0 (4C), 105.1, 93.0 (2C), 70.9 (2C), 55.3; LREIMS: m/z 364 (M^+), 320, 257, 240, 229, 181, 91 (base); HREIMS: m/z 364.1305 [M] $^+$ (364.1311 calcd. for $\text{C}_{22}\text{H}_{20}\text{O}_5$).

Butyl 2,6-bis(benzyloxy)-4-methoxybenzoate (**81a**) の合成



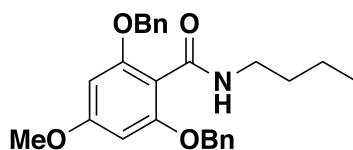
化合物 **80** (100 mg, 0.27 mmol) を CH_2Cl_2 (2.0 mL) に溶かし, $n\text{BuOH}$ (100 μL , 1.09 mmol), DIPEA (150 μL , 0.86 mmol) および HATU (126 mg, 0.331 mmol) を加え, 室温にて 1 時間攪拌した. 反応液を水に注ぎ EtOAc で 3 回抽出した. 有機層を集め, 水および飽和食塩水で洗浄後, 無水硫酸ナトリウムで乾燥し, 溶媒を留去した. 残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付し, hexane- EtOAc (19:1-2:1) で溶出させ, hexane- EtOAc (19:1-9:1) で溶出した画分より **81a** (46.7 mg, 0.11 mmol, 40%) を得た. **81a**: Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.26-7.40 (10H, m), 6.13 (2H, s), 5.07 (4H, s), 4.27 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.71 (3H, s), 1.57-1.65 (2H, m), 1.32 (2H, sext, $J = 7.5$ Hz), 0.83 (3H, t, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 166.4, 162.1, 157.5 (2C), 136.6 (2C), 128.4 (4C), 127.8 (2C), 127.0 (4C), 107.7, 92.5 (2C), 70.5 (2C), 64.9, 55.3, 30.7, 19.0, 13.6; LREIMS: m/z 420 (M^+), 347, 329, 163, 91 (base); HREIMS: m/z 420.1935 [M] $^+$ (420.1937 calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{O}_5$).

また **81b~g** の合成についても同様の手法により行った. 化合物 **80** に pentanol, butylamine, pentylamine, heptylamine, octylamine を縮合させることで **81b~g** をそれぞれ収率 38%, 90%, 66%, 55%, 58%, 52% で得た.

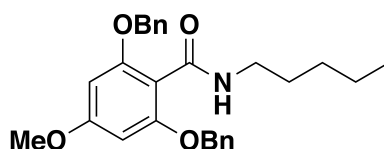


Pentyl 2,6-bis(benzyloxy)-4-methoxybenzoate (**81b**): Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.26-7.40 (10H, m), 6.13 (2H, s), 5.07 (4H, s), 4.26 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.71 (3H, s), 1.60-1.67 (2H, m), 1.25-1.32 (4H, m), 0.82 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ

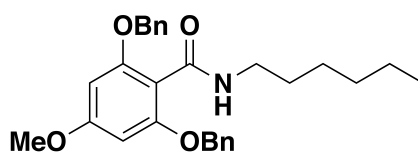
166.4, 162.1, 157.5 (2C), 136.6 (2C), 128.4 (4C), 127.8 (2C), 127.0 (4C), 107.7, 92.5 (2C), 70.5 (2C), 65.2, 55.3, 28.3, 28.0, 22.2, 13.9; LREIMS: m/z 434 (M^+), 347, 343, 181, 177, 91 (base); HREIMS: m/z 434.2082 [M] $^+$ (434.2093 calcd. for $C_{27}H_{30}O_5$).



2,6-Bis(benzyloxy)-*N*-butyl-4-methoxybenzamide (**81c**): Pale yellow amorphous solid; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.26-7.43 (10H, m), 6.15 (2H, s), 5.73 (1H, br.t, $J = 5.8$ Hz), 5.07 (4H, s), 3.71 (3H, s), 3.37 (2H, dt, $J = 5.8, 7.5$ Hz), 1.38-1.46 (2H, m), 1.22-1.31 (2H, m), 0.81 (3H, t, $J = 7.4$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 165.3, 161.7, 157.5 (2C), 136.7 (2C), 128.4 (4C), 127.8 (2C), 127.1 (4C), 110.7, 92.9 (2C), 70.7 (2C), 55.3, 39.5, 31.6, 20.0, 13.7; LREIMS: m/z 419 (M^+), 402, 328, 312, 257, 255, 162, 91 (base); HREIMS: m/z 419.2080 [M] $^+$ (419.2097 calcd. for $C_{26}H_{29}NO_4$).

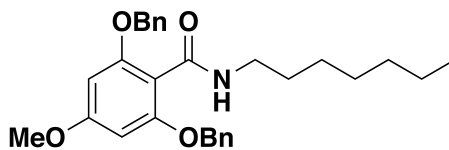


2,6-Bis(benzyloxy)-4-methoxy-*N*-pentylbenzamide (**81d**): Pale yellow amorphous solid; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.25-7.41 (10H, m), 6.13 (2H, s), 5.76 (1H, br.t, $J = 5.7$ Hz), 5.05 (4H, s), 3.70 (3H, s), 3.36 (2H, dt, $J = 5.7, 7.5$ Hz), 1.40-1.47 (2H, m), 1.21-1.27 (4H, m), 0.81 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 165.3, 161.6, 157.4 (2C), 136.6 (2C), 128.4 (4C), 127.7 (2C), 127.0 (4C), 110.7, 92.8 (2C), 70.6 (2C), 55.3, 39.8, 29.1, 28.9, 22.2, 13.9; LREIMS: m/z 433 (M^+), 416, 342, 312, 257, 255, 176, 91 (base); HREIMS: m/z 433.2249 [M] $^+$ (433.2253 calcd. for $C_{27}H_{31}NO_4$).

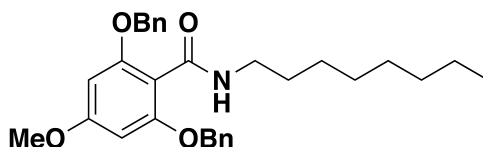


2,6-Bis(benzyloxy)-*N*-hexyl-4-methoxybenzamide (**81e**): Pale yellow amorphous solid; 1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 7.25-7.40 (10H, m), 6.13 (2H, s), 5.77 (1H, br.t, $J = 5.7$ Hz), 5.05 (4H, s), 3.70 (3H, s), 3.35 (2H, dt, $J = 5.7, 7.2$ Hz), 1.43 (2H, quint, $J = 7.2$ Hz), 1.16-1.28 (2H, m), 0.84 (3H, t, $J = 6.8$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$) δ 165.3, 161.6, 157.4 (2C), 136.6 (2C), 128.4 (4C), 127.7 (2C), 127.0 (4C), 110.7, 92.8 (2C), 70.6 (2C), 55.3, 39.8, 31.4, 29.4, 26.5, 22.4, 13.9; LREIMS: m/z 447 (M^+), 430, 356, 340, 257, 255, 190, 91 (base); HREIMS: m/z 447.2408 [M] $^+$ (447.2410 calcd. for

C₂₈H₃₃NO₄).

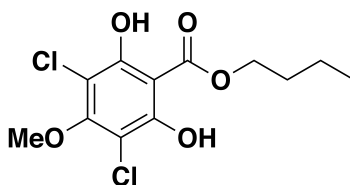


2,6-Bis(benzyloxy)-*N*-heptyl-4-methoxybenzamide (**81f**): Pale yellow amorphous solid; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25-7.41 (10H, m), 6.14 (2H, s), 5.75 (1H, br.t, *J* = 5.7 Hz), 5.06 (4H, s), 3.71 (3H, s), 3.36 (2H, dt, *J* = 5.7, 7.0 Hz), 1.43 (2H, quint, *J* = 7.4 Hz), 1.14-1.28 (8H, m), 0.86 (3H, t, *J* = 7.2 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.3, 161.6, 157.5 (2C), 136.7 (2C), 128.4 (4C), 127.7 (2C), 127.0 (4C), 110.7, 92.8 (2C), 70.6 (2C), 55.3, 39.8, 31.6, 29.5, 28.9, 26.8, 22.5, 14.0; LREIMS: *m/z* 461 (M⁺), 444, 370, 354, 257, 255, 204, 91 (base); HREIMS: *m/z* 461.2559 [M]⁺ (461.2566 calcd. for C₂₉H₃₅NO₄).



2,6-Bis(benzyloxy)-4-methoxy-*N*-octylbenzamide (**81g**): Pale yellow amorphous solid; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.25-7.41 (10H, m), 6.14 (2H, s), 5.75 (1H, br.t, *J* = 6.0 Hz), 5.06 (4H, s), 3.71 (3H, s), 3.36 (2H, dt, *J* = 6.0, 7.2 Hz), 1.43 (2H, quint, *J* = 7.4 Hz), 1.19-1.29 (10H, m), 0.87 (3H, t, *J* = 7.0 Hz); ¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 165.3, 161.6, 157.5 (2C), 136.7 (2C), 128.4 (4C), 127.7 (2C), 127.0 (4C), 110.7, 92.9 (2C), 70.6 (2C), 55.3, 39.8, 31.8, 29.5, 29.2, 29.1, 26.8, 22.6, 14.0; LREIMS: *m/z* 475 (M⁺), 458, 384, 368, 257, 255, 218, 91 (base); HREIMS: *m/z* 475.2711 [M]⁺ (475.2723 calcd. for C₃₀H₃₇NO₄).

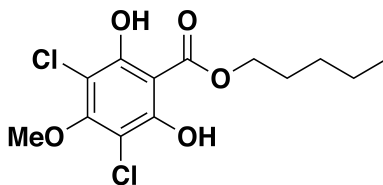
Butyl 3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxybenzoate (**34**) の合成



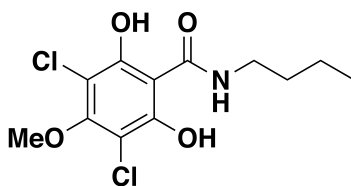
化合物 **81a** (46.7 mg, 0.11 mmol) を MeOH (3.0 mL) に溶かし, 20% Pd(OH)₂ on carbon (15.0 mg) を加え, 水素雰囲気下室温で 1 時間攪拌し, 反応液を濾過後溶媒を留去した. 残渣を CHCl₃-EtOH (100:1) (2.0 mL) に溶かし, 0 °C において SO₂Cl₂ (26.4 mg, 0.196

mmol) を加え、1 時間攪拌した。溶媒を留去し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィに付し、hexane-EtOAc (19:1) で溶出させ、hexane-EtOAc (19:1) で溶出した画分より **34** (24.1 mg, 0.078 mmol, 70% for 2 steps) を得た。 **34**: Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.39 (2H, br.s), 4.56 (2H, t, $J = 6.7$ Hz), 3.97 (3H, s), 1.84 (2H, tt, $J = 6.7, 7.5$ Hz), 1.49 (2H, sext, $J = 7.5$ Hz), 1.00 (3H, t, $J = 7.5$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.9, 159.2, 156.0 (2C), 108.1, 97.8 (2C), 67.5, 60.9, 30.3, 19.1, 13.5; LREIMS: m/z 312 (M+4), 310 (M+2), 308 (M^+), 254, 252, 238, 236, 234 (base); HREIMS: m/z 308, 0193 [M] $^+$ (308.0218 calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{14}^{35}\text{Cl}_2\text{O}_5$).

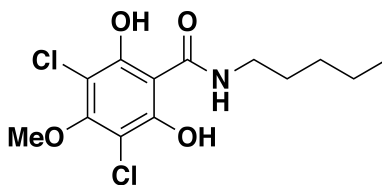
また **34~40** の合成についても同様の手法によりに行った。化合物 **81b~g** を接触還元および塩素化することで **34~40** をそれぞれ収率 75%, 31%, 23%, 56%, 20%, 28% で得た。



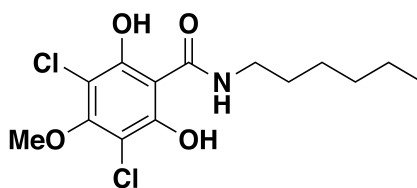
Pentyl 3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxybenzoate (**35**): Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.39 (2H, br.s), 4.55 (2H, t, $J = 6.8$ Hz), 3.97 (3H, s), 1.85 (2H, quint, $J = 6.8$ Hz), 1.39-1.45 (4H, m), 0.94 (3H, t, $J = 7.1$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.9, 159.2, 156.0 (2C), 108.1, 97.8 (2C), 67.8, 60.9, 28.1, 27.9, 22.2, 13.8; LREIMS: m/z 326 (M+4), 324 (M+2), 322 (M^+), 254, 252, 238, 236, 234 (base); HREIMS: m/z 322.0361 [M] $^+$ (322.0375 calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{16}^{35}\text{Cl}_2\text{O}_5$).



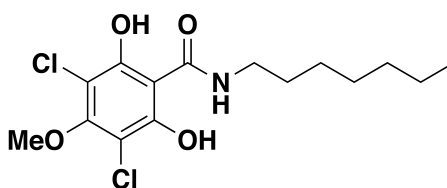
N-Butyl-3,5-dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxybenzamide (**36**): Pale yellow amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.88 (2H, br.s), 8.19 (1H, br.s), 3.94 (3H, s), 3.45 (2H, dt, $J = 5.6, 7.2$ Hz), 1.61 (2H, quint, $J = 7.2$ Hz), 1.41 (2H, sext, $J = 7.2$ Hz), 0.96 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 155.6, 154.4 (2C), 107.6, 100.5 (2C), 60.9, 39.4, 31.1, 20.1, 13.7; LREIMS: m/z 311 (M+4), 309 (M+2), 307 (M^+), 238, 236, 234 (base), 74; HREIMS: m/z 307.03556 [M] $^+$ (307.0378 calcd. for $\text{C}_{12}\text{H}_{15}^{35}\text{Cl}_2\text{NO}_4$).



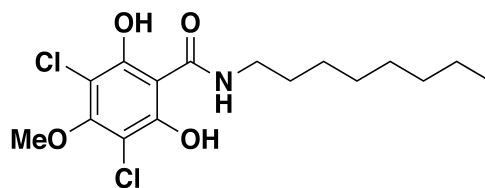
3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxy-*N*-pentylbenzamide (**37**): Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 3.85 (3H, s), 3.38 (2H, t, $J = 7.0$ Hz), 1.61 (2H, quint, $J = 7.0$ Hz), 1.38-1.42 (4H, m), 0.94 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CD_3OD) δ 171.8, 159.3, 157.1 (2C), 107.5, 60.9, 39.4, 31.1, 20.1, 13.7; LREIMS: m/z 325 ($\text{M}+4$), 323 ($\text{M}+2$), 321 (M^+), 238, 236, 234 (base), 149, 88; HREIMS: m/z 321.0514 [M] $^+$ (321.0435 calcd. for $\text{C}_{13}\text{H}_{17}^{35}\text{Cl}_2\text{NO}_4$).



3,5-Dichloro-*N*-hexyl-2,6-dihydroxy-4-methoxybenzamide (**38**): Pale yellow amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 10.86 (2H, br.s), 8.18 (1H, br.s), 3.95 (3H, s), 3.44 (2H, dt, $J = 5.6, 7.2$ Hz), 1.62 (2H, quint, $J = 7.2$ Hz), 1.30-1.42 (6H, m), 0.90 (3H, t, $J = 7.0$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 155.6, 154.4 (2C), 107.6, 100.5 (2C), 60.9, 39.7, 31.4, 29.1, 26.6, 22.5, 14.0; LREIMS: m/z 339 ($\text{M}+4$), 337 ($\text{M}+2$), 335 (M^+), 301, 265, 238, 236, 234 (base), 201, 200, 149, 102; HREIMS: m/z 335.0689 [M] $^+$ (335.0691 calcd. for $\text{C}_{14}\text{H}_{19}^{35}\text{Cl}_2\text{NO}_4$).



3,5-Dichloro-*N*-heptyl-2,6-dihydroxy-4-methoxybenzamide (**39**): Pale yellow amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (1H, br.s), 3.95 (3H, s), 3.44 (2H, dt, $J = 5.7, 7.0$ Hz), 1.62 (2H, quint, $J = 7.0$ Hz), 1.26-1.36 (8H, m), 0.89 (3H, t, $J = 7.0$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 155.6, 154.5 (2C), 107.6, 100.5 (2C), 60.9, 39.7, 31.7, 29.1, 28.9, 26.9, 22.5, 14.0; LREIMS: m/z 353 ($\text{M}+4$), 351 ($\text{M}+2$), 349 (M^+) (base), 315, 265, 238, 236, 234, 201, 200, 149, 116; HREIMS: m/z 349.0835 [M] $^+$ (349.0848 calcd. for $\text{C}_{15}\text{H}_{21}^{35}\text{Cl}_2\text{NO}_4$).



3,5-Dichloro-2,6-dihydroxy-4-methoxy-*N*-octylbenzamide (**40**): Colorless amorphous solid; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 8.15 (1H, br.s), 3.95 (3H, s), 3.44 (2H, dt, $J = 5.7, 7.2$ Hz), 1.61 (2H, quint, $J = 7.2$ Hz), 1.26-1.39 (10H, m), 0.88 (3H, t, $J = 7.2$ Hz); ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) δ 168.6, 155.6, 154.4 (2C), 107.6, 100.5 (2C), 60.9, 39.8, 31.8, 29.17, 29.16, 29.13, 27.0, 22.6, 14.0; LREIMS: m/z 367 ($\text{M}+4$), 365 ($\text{M}+2$), 363 (M^+) (base), 329, 265, 238, 236, 234, 201, 200, 130; HREIMS: m/z 363.0991 [M] $^+$ (363.1004 calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{23}^{35}\text{Cl}_2\text{NO}_4$).

第3章第2節の実験

各種活性試験は、群馬大学生体調節研究所准教授 久保原 禅先生に依頼し、以下のように行った。

K562, 3T3-L1 細胞を用いた細胞増殖抑制活性の評価および 3T3-L1 細胞を用いた糖代謝促進作用の評価については第2章第6節の実験と同様に行った。

HM44 細胞を用いた細胞性粘菌柄細胞分化誘導作用の評価

1. 培地の調整

培養培地は modified SM medium [D-(+)-glucose 0.75%, Bactopecton 1.0%, yeast extract 0.1%, KH_2PO_4 0.44%, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1%] を用いた。また、分化誘導の測定には salt solution (cAMP 5mM, NaCl 2 mM, KCl 10 mM, CaCl_2 1 mM, penicillin 50 $\mu\text{g/mL}$, streptomycin sulfate 100 $\mu\text{g/mL}$, MES-KOH 10 mM, pH 6.2) を用いた。

2. 細胞性粘菌の培養

餌に *Klebsiella aerogenes* を用い、HM44 細胞と共培養させた。

3. 分化誘導作用の測定

12 well plates の各 well に試料または溶媒 (DMSO) を含む 0.5 mL の salt solution を加え、そこに 2×10^5 cells/well の HM44 細胞を入れた。2 日後に位相差顕微鏡を用いて柄細胞へと分化した比率を評価した (柄細胞に分化すると細胞が空胞化するため、空胞化した細胞数を数え全細胞数に対する比率を計算した)。

参考文献

1. 前田靖男 編著 モデル生物：細胞性粘菌; アイピーシー, 2000.
2. Abe, H.; Uchiyama, M.; Tanaka, Y.; Saito, H. *Tetrahedron Lett.* **1976**, 42, 3807-3810.
3. Shimomura, O.; Suthers, H. L. B.; Bonner, J. T. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1982**, 79, 7376-7379.
4. Morris, H. R.; Taylor, G. W.; Masento, M. S.; Jermyn, K. A.; Kay, R. R. *Nature* **1987**, 328, 811-814.
5. Sawada, T.; Aono, M.; Asakawa, S.; Ito, A.; Awano, K. *J. Antibiot.* **2000**, 53, 959-966.
6. Takaya, Y.; Kikuchi, H.; Terui, Y.; Komiya, J.; Furukawa, K.; Seya, K.; Motomura, S.; Ito, A.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 985-989.
7. Takaya, Y.; Kikuchi, H.; Terui, Y.; Komiya, J.; Maeda, Y.; Ito, A.; Oshima, Y. *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 61-63.
8. Kikuchi, H.; Saito, Y.; Komiya, J.; Takaya, Y.; Honma, S.; Nakahata, N.; Ito, A.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 6982-6987.
9. Kikuchi, H.; Komiya, J.; Saito, Y.; Sekiya, J.; Honma, S.; Nakahata, N.; Oshima, Y. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 1477-1480.
10. Kikuchi, H.; Saito, Y.; Sekiya, J.; Okano, Y.; Saito, M.; Nakahata, N.; Kubohara, Y.; Oshima, Y. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 8854-8858.
11. Kikuchi, H.; Oshima, Y.; Ichihara A.; Gokan N.; Hasegawa A.; Hosaka K.; Kubohara, Y. *Life Sci.* **2006**, 80, 160-165.
12. 齊藤純英, 学士論文, 東北大学薬学部, **2009**.
13. 中村光史, 修士論文, 東北大学薬学研究科, **2006**.
14. 岩波生物学辞典 第4版 八杉龍一, 小関治男, 古谷雅樹, 日高敏隆 編; 岩波書店, 1996; pp 1560-1574.
15. Town, C. D.; Gross, J. D.; Kay, R. R. *Nature* **1976**, 262, 717-719.

16. Masemto, M. S.; Morris, H. R.; Taylor, G. W.; Johnson, S. J.; Skapski, A. C.; Kay, R. R. *Biochem. J.* **1988**, *256*, 23-28.
17. (a) Kubohara, Y.; Okamoto, K. *FASEB J.* **1994**, *8*, 869-874. (b) Schaap, P.; Nebl, T.; Fisher, P. R. *EMBO J.* **1996**, *15*, 5177-5183.
18. Wurster, B.; Kay, R. R. *Dev. Biol.* **1990**, *140*, 189-195.
19. Oka, H.; Asahi, K.; Morishima, H.; Sanada, M.; Shiratori, K.; Iimura, Y.; Sakurai, T.; Uzawa, J.; Iwadare, S.; Takahashi, N. *J. Antibiot.* **1985**, *38*, 1100-1102.
20. Kopachik, W.; Oohata, A.; Dhokia, B.; Brookman, J. J.; Kay, R. R. *Cell* **1983**, *33*, 397-403.
21. Kubohara, Y.; Okamoto, K.; Tanaka, Y.; Asaahi, K.; Sakurai, A.; Takahashi, N. *FEBS Lett.* **1993**, *322*, 73-75.
22. Asahi, K.; Sakurai, A.; Takahashi, N.; Kubohara, Y.; Okamoto, K.; Tanaka, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *208*, 1036-1039.
23. Kubohara, Y. *Eur. J. Pharmacol.* **1999**, *381*, 57-62.
24. Gokan, N.; Kikuchi, H.; Nakamura, K.; Oshima, Y.; Hosaka, K.; Kubohara, Y. *Biochem. Pharmacol.* **2005**, *70*, 676-685.
25. Omata, W.; Shibata, H.; Nagasawa, M.; Kojima, I.; Kikuchi, H.; Oshima, Y.; Hosaka, K.; Kubohara, Y. *FEBS J.* **2007**, *274*, 3392-3404.
26. Kubohara, Y.; Kikuchi, H.; Oshima, Y. *Life Sci.* **2008**, *83*, 608-612.
27. Kikuchi, H.; Ishiko, S.; Oshima, Y.; Gokan N.; Hosaka K.; Kubohara, Y. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *377*, 1012-1017.
28. Coxon, B.; Fatiadi, J. A.; Sniegowski, T. L.; Hertz, S. H. *J. Org. Chem.* **1977**, *42*, 3132-3140.
29. Fraisse, L.; Verlhac, J. B.; Roche, B.; Rascle, M. C.; Rabion, A.; Seris, J. L. *J. Med. Chem.* **1993**, *36*, 1465-1473.
30. Deeming, A. J.; Rothwell, I. P. *J. Organomet. Chem.* **1981**, *205*, 117-131.
31. 生化学辞典 第2版 大島泰郎, 太田隆久, 香川靖雄, 上代淑人, 鈴木紘一, 青山洋右, 永井克孝, 野島庄七 編; 東京化学同人, 1991; pp 326.

32. Schaap, P.; Winckler, T.; Nelson, M.; Alvarez-Curto, E.; Elgie, B.; Hagiwara, H.; Cavender, J.; Milano-Curto, A.; Rozen, D. E.; Dingermaun, T.; Mutzel, R.; Baldauf, S. L. *Science* **2006**, *314*, 661-663.
33. Mossialos, D.; Meyer, J.-M.; Budzikiewicz, H.; Wolff, U.; Koedam, N.; Baysse, C.; Anjaiah, V.; Cornelis, P. *Appl. Environ. Microbiol.* **2000**, *66*, 487-492.
34. du Moulinet d'Hardemare, A.; Serratrice, G.; Pierre, J.-L. *BioMetals* **2004**, *17*, 691-694.
35. Giordano, C.; Minisci, F.; Vismara, E.; Levi, S. *J. Org. Chem.* **1986**, *51*, 536-537.
36. Littke, A. F.; Fu, G. C. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, *37*, 3387-3388.
37. Akaishi, E.; Narita, T.; Kawai, S.; Miwa, Y.; Sasaguri, T.; Hosaka, K.; Kubohara, Y. *Eur. J. Pharmacol.* **2004**, *485*, 21-29.

謝辞

本研究に際し、始終御懇篤なる御指導、御鞭撻を賜りました東北大学大学院薬学研究科教授 大島 吉輝先生に謹んで御礼申し上げます。

また、本論文の審査にあたり、有益なご助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科准教授 叶 直樹先生に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、細部に至る御指導と御助言を賜りました東北大学大学院薬学研究科助教 菊地 晴久先生に謹んで御礼申し上げます。様々な御力添えをいただきました東北大学大学院薬学研究科教授 倉田 祥一郎先生、また数々の御助言をいただきました東北大学大学院薬学研究科助教 加藤 泰弘先生に厚く御礼申し上げます。

細胞性粘菌の貴重な試料を御提供いただきました杏林製薬株式会社 伊藤 明博士、筑波大学大学院生命環境化学研究科教授 漆原 秀子先生、元国立科学博物館植物研究部主任研究官 萩原 博光博士に深く感謝いたします。

細胞性粘菌および哺乳類細胞を用いた生物活性試験に関して多大なるお力添えをいただきました群馬大学生体調節研究所准教授 久保原 禅先生に心から御礼申し上げます。

NMR スペクトル、質量スペクトル測定の労をとられました東北大学大学院薬学研究科中央分析室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

最後に、公私共に御支援いただいた有泉 加奈子修士をはじめとする東北大学大学院薬学研究科医薬資源化学分野の皆様心より感謝致します。